



CENTRO AGRONÓMICO TROPICAL
DE INVESTIGACIÓN Y ENSEÑANZA
ESCUELA DE POSGRADO

**Uso de hongos endofíticos de *Trichoderma* spp., para el biocontrol del Mal de
Panamá (*Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense*) raza tropical 1 en vitroplantas del cultivar
Gros Michel (AAA)**

por

Álvaro José Caballero Hernández

Tesis sometida a consideración de la Escuela de Posgrado
como requisito para optar por el grado de

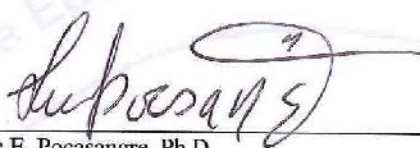
Magister Scientiae en en Agricultura Ecológica

Turrialba, Costa Rica, 2011

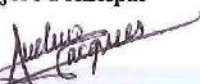
Esta tesis ha sido aceptada en su presente forma por la División de Educación y la Escuela de Posgrado del CATIE y aprobada por el Comité Consejero del Estudiante como requisito parcial para optar por el grado de:

MAGISTER SCIENTIAE EN AGRICULTURA ECOLÓGICA

FIRMANTES:



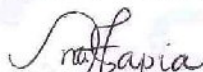
Luis E. Pocasangre, Ph.D.
Consejero Principal



Jacques Avelino, Ph.D.
Miembro Comité Consejero



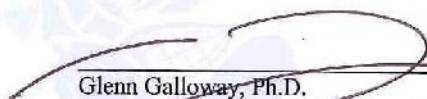
Fernando Casanoves, Ph.D.
Miembro Comité Consejero



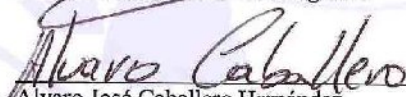
Ana Tapia, M.Sc.
Miembro Comité Consejero



Juan L. Ortiz, M.Sc.
Miembro Comité Consejero



Glenn Galloway, Ph.D.
Decano de la Escuela de Posgrado



Alvaro José Caballero Hernández
Candidato

DEDICATORIA

A Dios por concederme la sabiduría necesaria y a la Virgen Santísima por guiarme en el mejor de los caminos.

A mi madre por enseñarme el camino a la superación y que estará siempre en mi corazón.

A mi esposa por ser mi apoyo en todo momento.

A mi hija por regalarme su ternura y una linda sonrisa a diario.

AGRADECIMIENTOS

Al Servicio Alemán de Intercambio Académico (DAAD), por el soporte financiero brindado para la realización de mis estudios de maestría.

Al Dr. Luis Pocasangre, consejero principal, por su excelente orientación, disposición y apoyo brindado durante el desarrollo de mi investigación.

Al Dr. Fernando Casanoves, Dr. Jacques Avelino, M.Sc. Ana Tapia y M.Sc. Juan Ortiz al proporcionarme valiosas contribuciones como miembros del Comité Consejero.

A mi compatriota y amigo M.Sc. Sergio Vilchez por brindarme sus valiosos aportes.

Al personal del Laboratorio de Fitopatología y Nematología del CATIE, por su colaboración para el desarrollo de la tesis.

Al personal de la Biblioteca Orton, por su amabilidad, disposición y apoyo.

Al personal de la Escuela de Posgrado de CATIE, por su apoyo durante mi permanencia en esta alma mater.

A la Universidad Nacional Autónoma de Nicaragua (UNAN-León) por creer en mí.

CONTENIDO

DEDICATORIA	III
AGRADECIMIENTOS	IV
CONTENIDO	V
RESUMEN	IX
ABSTRACT.....	X
ÍNDICE DE CUADROS	XI
ÍNDICE DE FIGURAS	XIII
1 INTRODUCCIÓN	1
1.1 Objetivos del estudio.....	3
1.1.1 Objetivo general	3
1.1.2 Objetivos específicos.....	3
1.2 Hipótesis del estudio	3
2 REVISIÓN DE LITERATURA.....	4
2.1 Taxonomía, origen y distribución del banano.....	4
2.2 Importancia del cultivo de banano (<i>Musa spp.</i>).....	6
2.3 Distribución del Mal de Panamá e importancia económica.....	7
2.4 Descripción de las razas fisiológicas de <i>Fusarium oxysporum</i> f. sp. <i>cubense</i>	9
2.5 Factores agroclimáticos de <i>Fusarium oxysporum</i> f. sp. <i>cubense</i>	10
2.6 Biología de <i>Fusarium oxysporum</i> f. sp. <i>cubense</i>	10
2.7 Infección, epidemiología y ciclo de la enfermedad Mal de Panamá	12
2.8 Hospederos alternos de <i>Fusarium oxysporum</i> f. sp. <i>cubense</i>	13
2.9 Síntomas de la enfermedad Mal de Panamá	14
2.10 Estado actual del manejo del Mal de Panamá.....	16
	V

2.10.1	Prácticas culturales	16
2.10.2	Resistencia genética.....	17
2.10.3	Combate biológico.....	18
2.10.4	Hongos endofíticos	18
2.10.5	Endofíticos como agentes de biocontrol de la marchitez por <i>Fusarium</i>	19
2.10.6	Interacciones <i>Trichoderma</i> -Planta-Patógeno.....	20
2.10.6.1	Interacción <i>Trichoderma</i> -Patógeno.....	20
2.10.6.1.1	Micoparasitismo y enzimas líticas	21
2.10.6.1.2	Antibiosis y metabolitos secundarios.....	22
2.10.6.1.3	Competencia de espacio y nutrientes con los patógenos.....	22
2.10.6.2	Interacción <i>Trichoderma</i> -planta.....	23
2.10.6.2.1	Colonización de <i>Trichoderma</i> spp., en las raíces	23
2.10.6.2.2	Promoción del crecimiento vegetativo en las plantas	23
2.10.6.2.3	Mecanismos de defensas generados por la planta.....	24
3	MATERIALES Y MÉTODOS	25
3.1	Ubicación geográfica de la investigación	25
3.2	Material experimental	25
3.2.1	Aislamientos de <i>Fusarium oxysporum</i> f. sp. <i>cubense</i>	25
3.2.2	Aislamientos de hongos endofíticos de <i>Trichoderma</i> spp.	26
3.2.3	Material vegetal	27
3.3	Cultivo y multiplicación de los aislamientos de <i>Fusarium oxysporum</i> f. sp. <i>cubense</i> ..	27
3.4	Cultivo y multiplicación de los aislamientos de <i>Trichoderma</i> spp.....	28
3.5	Preparación de la suspensión de esporas de <i>Fusarium oxysporum</i> f. sp. <i>cubense</i>	28
3.6	Preparación de la suspensión de esporas de los <i>Trichoderma</i> spp.....	29
3.7	Bioensayo 1. Prueba de antibiosis por medio de los cocultivo sobre los tres aislamientos de <i>Fusarium oxysporum</i> f. sp. <i>cubense</i> y hongos endofíticos de <i>Trichoderma</i> spp.	29
3.7.1	Evaluación del crecimiento radial de los aislamientos de <i>Fusarium oxysporum</i> f. sp. <i>cubense</i> y de los hongos endofíticos de <i>Trichoderma</i> spp.	30

3.8	Bioensayo 2. Prueba de biocontrol	31
3.8.1	Protección de vitroplantas con hongos endofíticos de <i>Trichoderma</i> spp.....	31
3.8.2	Inoculación de vitroplantas con aislamientos de <i>Fusarium oxysporum</i> f. sp. <i>cubense</i>	32
3.8.3	Evaluación de la incidencia y la severidad de la enfermedad	32
3.9	Métodos estadísticos	33
3.9.1	Bioensayo 1. Prueba de cocultivo sobre tres aislamientos de FOC	34
3.9.2	Bioensayo 2. Prueba de biocontrol sobre dos aislamientos de FOC.....	35
4	RESULTADOS.....	38
4.1	Bioensayo 1. Prueba de antibiosis sobre tres aislamientos de <i>Fusarium oxysporum</i> f. sp. <i>cubense</i>	38
4.2	Bioensayo 2. Prueba de biocontrol sobre los dos aislamientos de <i>Fusarium oxysporum</i> f. sp. <i>cubense</i>	39
4.2.1	Incidencia y severidad de la enfermedad.....	39
4.2.2	Evaluación de síntomas internos	42
4.2.3	Variables de crecimiento	43
4.2.4	Medición de las variables peso foliar, peso radical y peso de la planta.....	49
4.2.5	Correlación de las variables del bioensayo de biocontrol y de antibiosis.....	50
4.2.6	Agrupación de los aislamientos endofíticos de <i>Trichoderma</i> spp., por medios de las variables repuestas en la prueba de biocontrol	51
5	DISCUSIÓN	54
5.1	Bioensayo 1. Prueba de antibiosis sobre los tres aislamientos de <i>Fusarium oxysporum</i> f. sp. <i>cubense</i>	54
5.2	Bioensayo 2. Prueba de biocontrol sobre los dos aislamientos de <i>Fusarium oxysporum</i> f. sp. <i>cubense</i>	55
5.3	Promoción de crecimiento de los aislados endofíticos de <i>Trichoderma</i> spp.	58
6	CONCLUSIONES	60
6.1	Prueba de antibiosis	60
6.2	Prueba de biocontrol	60

6.3	Promoción de crecimiento	61
7	RECOMENDACIONES.....	62
8	BIBLIOGRAFÍA	63
	ANEXO	80

CABALLERO HERNÁNDEZ, A.J. 2010. USO DE HONGOS ENDOFITICOS DE *TRICHODERMA* SPP., PARA EL BIOCONTROL DEL MAL DE PANAMÁ (*FUSARIUM OXYSPORUM* F. SP. *CUBENSE*) RAZA TROPICAL 1 EN VITROPLANTAS DEL CULTIVAR GROS MICHEL (AAA)

Palabras claves: *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense*, Mal de Panamá, banano, Gros Michel (AAA), hongos endofíticos, control biológico.

RESUMEN

El objetivo de la presente investigación fue seleccionar aislamientos de hongos endofíticos de *Trichoderma* spp., para el biocontrol de *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* raza 1. Se evaluaron los tres aislamientos más patogénicos FOC2, FOC4, FOC8 obtenidos del criobanco del Laboratorio de Fitopatología y Nematología de CATIE, en una prueba de antibiosis y posteriormente se procedió a realizar la prueba de biocontrol con veinte aislamientos de *Trichoderma* spp. Y dos aislamientos FOC2 y FOC4 en vitroplantas de Gros Michel (AAA) en condiciones de invernadero. Por medio de la técnica de cocultivos veinte hongos endofíticos inhibieron el crecimiento radial de FOC hasta en un 53,46% en comparación con los testigos referenciales. En el bioensayo de biocontrol, la mayoría de los tratamientos presentaron los primeros síntomas al final de la tercera semana. Plantas protegidas con hongos endofíticos retrasaron la aparición de la enfermedad hasta la cuarta semana. Los resultados demostraron que los hongos endofíticos presentaron un mínimo porcentaje de incidencia, siendo TJ5 el que sobresalió con un menor porcentaje de 37,5%, no presentando el testigo absoluto ningún síntoma. Así mismo hongos endofíticos TC9, TP3 y TCL1 redujeron desde un 92% hasta 90% los síntomas externos en comparación a los testigos referenciales. Los síntomas internos del cormo se redujeron hasta un 74% por el hongo endofítico TC9. Adicionalmente se detectó que plantas protegidas con hongos endofíticos promovieron el crecimiento en las variables altura de la planta, número de hojas, diámetro del pseudotallo, ancho de la tercera hoja, peso de radical, peso del follaje y peso total de la planta. Se presentaron correlaciones entre las variables del bioensayo de biocontrol y se obtuvo el grupo élite de *Trichoderma* spp., para este estudio.

CABALLERO HERNÁNDEZ, A.J. 2010. USE OF ENDOPHYTIC FUNGUS OF *TRICHODERMA* SPP., FOR THE BIOCONTROL OF THE PANAMÁ DISEASE (*FUSARIUM OXYSPORUM* F. SP. *CUBENSE*) TROPICAL RACE 1 IN VITROPLANTS OF CULTIVAR GROS MICHEL (AAA)

Key words: *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense*, Panama disease, banana, Gros Michel (AAA), endophytic fungus, biological control.

ABSTRACT

The objective of this research was to select isolates of endophytic fungi of *Trichoderma* spp., for the biocontrol of *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* race 1. We evaluated the three most pathogenic isolates FOC2, FOC4, FOC8 cryobank obtained from the Laboratory of Plant Pathology and Nematology at CATIE, in a test of antibiosis and then proceeded to test twenty biocontrol isolates of *Trichoderma* spp., and two isolates FOC4 and FOC2 in vitroplantas of Gros Michel (AAA) under greenhouse conditions. Through the coculture technique twenty endophytic fungi inhibited radial growth of FOC up to 53,46% in comparison with reference control. In the bioassay of biocontrol, most treatments showed the first symptoms after the third week. Protected plants with endophytic fungi delayed the appearance of the disease until the fourth week. The results showed that endophytic fungi showed a small percentage of incidence being the TJ5 who excelled with the lowest percentage of 37,5%, without showing any symptoms absolute control. Also TC9 endophytic fungi, TP3 and TCL1 reduced from 92% to 90% external symptoms, compared to reference control. Corm internal symptoms were reduced to 74% by the endophytic fungus TC9. Additionally it was found that protected plants endophytic fungi in promoting growth in the variables plant height, leaf number, pseudostem diameter, width of third leaf, root weight, leaf weight and total weight of the plant. There were correlations between the bioassay of biocontrol and obtained an elite group of *Trichoderma* spp., for this study.

ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro 1. Razas conocidas de <i>Fusarium oxysporum</i> f. sp. <i>cubense</i> (Stover y Simmonds 1987)	10
Cuadro 2. Caracterización de los aislamientos de <i>Fusarium oxysporum</i> f. sp. <i>cubense</i> evaluados.....	25
Cuadro 3. Descripción de los aislamientos endofíticos de <i>Trichoderma</i> spp., evaluados en esta investigación	26
Cuadro 4. Escala de evaluación de síntomas provocados por <i>Fusarium oxysporum</i> f. sp. <i>cubense</i>	33
Cuadro 5. Variables evaluadas en los bioensayos de la investigación	34
Cuadro 6. Efecto de hongos endofíticos sobre la incidencia del Mal de Panamá en ocho semanas de evaluación	41
Cuadro 7. Efecto de los hongos endofíticos y porcentajes de reducción (entre paréntesis) sobre el amarillamiento y severidad del Mal de Panamá en ocho semanas de evaluación....	42
Cuadro 8. Efecto de los hongos endofíticos y porcentajes de reducción (entre paréntesis) sobre la decoloración del corno de vitroplantas del banano del cultivar Gros Michel (AAA) en la prueba de biocontrol.....	43
Cuadro 9. Evaluaciones de la variable altura (cm) realizadas durante las once semanas en vitroplantas de banano durante el ensayo de biocontrol bajo condiciones de invernadero.....	45
Cuadro 10. Evaluaciones de la variable número de hojas realizada en la prueba de biocontrol en plantas de banano del cultivar Gros Michel (AAA) bajo condiciones de invernadero	46
Cuadro 11. Evaluaciones de la variable diámetro del pseudotallo (cm) realizada en la prueba de biocontrol en plantas de banano del cultivar Gros Michel (AAA) bajo condiciones de invernadero.....	47

Cuadro 12. Evaluaciones de la variable ancho de la tercera hoja (cm) realizada en la prueba de biocontrol en plantas de banano del cultivar Gros Michel (AAA) bajo condiciones de invernadero.....	48
Cuadro 13. Mejores aislamientos de <i>Trichoderma</i> spp., y porcentajes relativos (entre paréntesis) para las variables peso radical (g), peso del follaje (g) y peso de la planta (g) al sacrificar las plantas en la finalización del bioensayo de biocontrol.....	50
Cuadro 14. Comportamiento de los 20 mejores aislamientos endofíticos de <i>Trichoderma</i> spp., en las pruebas de cocultivo y biocontrol por medio de una prueba de coeficiente de correlación de Spearman.....	51
Cuadro 15. Clasificación de los grupos de aislamientos endofíticos de <i>Trichoderma</i> spp., obteniéndose el número de individuos y el promedio para cada grupo en sus variables	53

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Planta madre de banano, hijo de sucesión e inflorescencia (Champion 1963).	6
Figura 2. Estructuras reproductivas de <i>Foc</i> observadas al microscopio a) microconidias b) macroconidias c) clamidosporas (Lara 2009).	11
Figura 3. Inicio de la enfermedad y ciclo de vida de <i>Fusarium oxysporum</i> f. sp. <i>cubense</i> en plantas de banano (Daly y Walduck 2006).	13
Figura 4. Síntomas externos e internos del Mal de Panamá causados por <i>Fusarium oxysporum</i> f. sp. <i>cubense</i> en el cultivar Gros Michel (AAA), a) Hoja amarillenta en pie y hojas muertas colgando del pseudotallo, b) Corte longitudinal del pseudotallo, presentado una decoloración rojiza-café en sus haces vasculares de las vainas externas (Pocasangre 2009), c) Corte transversal del cormo, presentado una decoloración interna rojiza-café en la corteza y el cilindro central, d) Presencia de rajadura de pseudotallo infectado sobre el nivel del suelo.	15
Figura 5. Eventos de pre-contacto de la interacción micoparasítica de <i>Trichoderma</i> -hongos hospederos. Fase 1. El micoparásito produce componentes de alto peso molecular que alcanzan al hospedero. Fase 2. Productos degradados de bajo peso molecular que son liberados de la pared celular del hospedero alcanzando al micoparásito y activando los genes de expresión en cascada del micoparásito (Vinale <i>et al.</i> , 2008).	21
Figura 6. Protocolo para la preparación de una suspensión de esporas de <i>Fusarium oxysporum</i> f. sp. <i>cubense</i>	29
Figura 7. Protocolo para el cocultivo de <i>Fusarium oxysporum</i> f. sp. <i>cubense</i> y hongos endofíticos de <i>Trichoderma</i> spp.	30
Figura 8. Medición del crecimiento radial de las colonias de <i>Fusarium oxysporum</i> f. sp. <i>cubense</i> y <i>Trichoderma</i> spp. Después de ocho día de cocultivo.	30
Figura 9. Protocolo para la protección de vitroplantas de banano con hongos endofíticos de <i>Trichoderma</i> spp.	31

Figura 10. Efecto de hongos endofíticos sobre el crecimiento de <i>Fusarium oxysporum</i> f. sp. <i>cubense</i> en ocho evaluaciones.....	39
Figura 11. Incidencia del Mal de Panamá con dos aislamientos de <i>Fusarium oxysporum</i> f. sp. <i>cubense</i> en vitroplantas de banano del cultivar Gros Michel (AAA) durante ochos semanas de evaluación.....	40
Figura 12. Dendograma de grupos de aislamientos endofíticos de <i>Trichoderma</i> spp.....	52

1 INTRODUCCIÓN

El banano es uno de los principales cultivos dentro de los sistemas de producción agrícola en más de 120 países, donde constituye un alimento importante en la dieta básica de 400 millones de personas; con una producción de 104 millones de toneladas al año, en aproximadamente 10 millones de ha (Frison y Sharrock 1998; Perea 1998; Cárdenas 2001; FAO 2001; FAO 2004).

El Mal de Panamá, causado por el hongo *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* (*Foc*), es considerada una de las enfermedades más destructivas registradas en la historia; reportándose en Australia en 1874, Caribe y América Central en 1910 (Stover 1962; Stover y Simmonds 1987; Moore *et al.*, 1995).

Durante el periodo de 1910 a 1950, plantaciones comerciales de banano Gros Michel (AAA) fueron la base de exportaciones del Caribe y América Latina, pero la destrucción de sus plantaciones fue causada por la marchitez por *Foc* raza tropical 1, provocando el abandono y la desaparición de más de 80,000 ha (Stover 1986; Stover y Simmonds 1987; Ploetz 1994; More *et al.*, 1995; Hwang *et al.*, 2004; Pérez-Vicente 2004). Esto condujo a la adopción del clon Robusta (subgrupo Cavendish, AAA) en la década de 1950 y 1960, por su resistencia a *Foc* raza 1 (Stover 1962; Stover y Simmonds 1987; Moore *et al.*, 1995).

En la actualidad, el Mal de Panamá continúa siendo un problema, especialmente para pequeños productores que cultivan variedades susceptibles en asocio con café y cacao bajo sistemas de producción orgánica, así como en pequeñas fincas que producen banano para mercados locales, donde son muy apetecidos por su sabor y aroma (Umaña *et al.*, 2000; Silagyi 2002; Silagyi *et al.*, 2003). Por otra parte, plantaciones comerciales del cultivar Cavendish son susceptibles a la raza 4 de *Foc*, constituyendo una grave amenaza para la industria bananera del continente Americano (Ploetz 1994; Moore *et al.*, 1995; Pérez-Vicente 2004; Ploetz 2006).

Cuatro razas de *Foc* han sido ampliamente documentadas por varios autores (Stover 1962; Stover y Simmonds 1987; Moore *et al.*, 1995). La raza 1 de *Foc* ataca cultivares de Gros Michel (AAA), Apple (AAB), Silk (AAB), Taiwán Latundam (AAB). La raza 2 de *Foc* ataca cultivares Bluggoe (ABB), cooking banana y parientes cercanos a algunos tetraploides de Jamaica (AAAA). La raza 3 de *Foc* ataca a *Heliconias* spp., y se ha registrado en Australia,

Honduras, Costa Rica y Panamá. Por último, la raza 4 de *Foc* ataca a todos los cultivares de Cavendish (AAA), Gros Michel (AAA), Bluggoe (ABB), Taiwán Latundam (AAB) y Pisang Lilin (AA). Todas las razas de *Foc* están difundidas en las regiones donde se cultivan bananos y cultivares relacionados, a excepción de América Tropical donde *Foc* raza 4 está ausente (Stover 1986; Stover y Simmonds 1987; Ploetz 2006).

No existen medidas de combate químico eficientes de la enfermedad (Ploetz 1994), ni buenas prácticas culturales que reduzcan su incidencia y severidad. De acuerdo a lo anterior, se llevan a cabo investigaciones para la búsqueda de fuentes naturales de resistencia al patógeno (Matsumoto *et al.*, 1999; Cárdenas 2001; Zambrano *et al.*, 2007). Una de estas fuentes es la implementación de biocontrol con especies de *Trichoderma* desde 1930, a partir de estudios en tratamientos de semillas y aplicaciones en suelo (Weindling 1934; Harman 1951; Papavizas 1985; Moore *et al.*, 1995; Pérez *et al.*, 2003). Encontrándose que *T. harzianum* induce altos niveles de enzimas líticas (1-3 β glucanasa y quitinasa) sobre las células de las paredes de los patógenos *R. solani*, *P. aphanidermatum* y *Fusarium oxysporum* (Sivan y Chet 1987; Tronsmo 1996). Resultados de la actividad inhibitoria de cepas de *Trichoderma* spp., en tratamientos previos a la inoculación con *Foc* a cultivares susceptibles de banano, han sido reportados por varios autores (Mitov y Oliva 1975; Pérez- Vicente 2004). Estudios realizados por Pocasangre (2000) demuestran el efecto antagonista de hongos endofíticos (cepas no patogénicas de *Fusarium oxysporum*) contra *Radopholus similis* y la enfermedad del Mal de Panamá en plantas de banano del cultivar Gran Enano (AAA) con reducciones de hasta 76% en las poblaciones finales del nematodo, en comparación con plantas testigo. Además, se encontró un efecto significativo en la promoción de crecimiento de las plantas, representado en un incremento del peso radical de plantas del cultivar Gran Enano (AAA), Williams (AAA) y FHIA-23 (AAAA).

Adicionalmente, en otros cultivos se ha documentado la eficiencia de *Trichoderma harzianum* cepa A34 en el combate de *Fusarium* spp., en cultivos de frijol y claveles (Sandoval *et al.*, 1996; Sandoval y López 2000; Sandoval y López 2001). Además, Pérez *et al.*, (2003) concluyen que inoculaciones con *T. harzianum* cepa A34, previo a las infecciones con *Foc*, reducen significativamente la incidencia y la severidad del Mal de Panamá en materiales sanos de banano Gros Michel, Burro CEMSA, FHIA 03, FHIA 23.

Debido a que las alternativas químicas no han sido eficientes para el combate de esta enfermedad, la presente investigación tiene como finalidad evaluar la utilización de hongos endofíticos para el manejo del Mal de Panamá causado por *Foc*, en vitroplantas del cultivar Gros Michel (AAA), bajo condiciones de invernadero.

1.1 Objetivos del estudio

1.1.1 Objetivo general

Estudiar el efecto de los aislamientos de hongos endofíticos de *Trichoderma* spp., para el combate biológico del Mal de Panamá causado por *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* (*Foc*) raza tropical 1, en vitroplantas de banano del cultivar Gros Michel (AAA) bajo condiciones de invernadero.

1.1.2 Objetivos específicos

- Determinar el potencial de antibiosis de 50 aislamientos de *Trichoderma* spp., obtenidos de la colección de hongos endofíticos del Laboratorio de Fitopatología del CATIE, sobre tres aislamientos de *Foc* en condiciones *in vitro*.
- Realizar una prueba de biocontrol en vitroplantas de banano del cultivar Gros Michel (AAA) en condición de invernadero.
- Evaluar el efecto de los aislamientos de *Trichoderma* spp., sobre el crecimiento de las vitroplantas de banano del cultivar Gros Michel (AAA) en condiciones de invernadero.

1.2 Hipótesis del estudio

Aislamientos de *Trichoderma* spp., tienen la capacidad de inhibir el crecimiento *in vitro* de *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense*.

Aislamientos endofíticos de *Trichoderma* spp., en condiciones *in vivo* reducen los síntomas externos e internos de las vitroplantas del cultivar de Gros Michel (AAA).

Aislamientos endofíticos de *Trichoderma* spp., tienen la capacidad de promover el crecimiento de las vitroplantas de Gros Michel (AAA) en condiciones de invernadero.

2 REVISIÓN DE LITERATURA

2.1 Taxonomía, origen y distribución del banano

El banano *Musa* spp., es una planta monocotiledónea, perteneciente a la familia Musáceas y de orden Escitamiáceas o Zingiberales (Simmonds 1959; Simmonds 1962; Stover y Simmonds 1987; Soto 1990; León 2000; Ortiz *et al.*, 2001). Es un nombre importado de África vía España y coincide parcialmente con su equivalente en inglés y francés (Stover y Simmonds 1987; Soto 1990; León 2000; Ortiz *et al.*, 2001). Banano se aplica a cultivares cuya fruta es de pulpa suave y se come fresca, como el Gros Michel y Cavendish siendo triploides de *Musa acuminata* pura (AAA) (Simmonds 1959; Simmonds 1962; Stover y Simmonds 1987; Soto 1990; León 2000; Ortiz *et al.*, 2001). Las Musáceas cultivadas pertenecen a la sección de Eumusa siendo un grupo complejo tanto de bananos (*Musa acuminata*, A) como de plátanos (*Musa balbisiana*, B) incluyendo clones (Simmonds 1959; Simmonds 1962; Stover y Simmonds 1987; Soto 1990; León 2000; Ortiz *et al.*, 2001). El principal factor de variación en plantas *Musa* es la poliploidía, porque son más vigorosas, resistentes, de mayor productividad y de la más amplia adaptación, presentando los siguientes niveles: a) triploides de *Musa acuminata* pura (AAA), son los clones comerciales más difundidos como Gros Michel y grupo Cavendish; b) triploides híbridos AAB o ABB son plátanos de importancia especial en la alimentación de América tropical; c) tetraploides pueden ser AAAA, ABBB, AAAB y AABB siendo clones artificiales y frutos de calidad inferior (Simmonds 1959; Simmonds 1962; Stover y Simmonds 1987; Soto 1990; León 2000; Ortiz *et al.*, 2001).

Asimismo la esterilidad en los bananos (carencia de semillas en los frutos), es una característica de gran importancia a nivel comercial y la partenocarpia determina en los bananos el crecimiento de los tejidos centrales del fruto independientemente de la fertilización (Simmonds 1959; Simmonds 1962; Stover y Simmonds 1987; Soto 1990; León 2000; Ortiz *et al.*, 2001).

En los triploides se combinan la esterilidad con la partenocarpia, procesos que impiden la formación de semillas con los que determinan el crecimiento del fruto sin necesidad de fecundación; esta característica favorable del fruto y su propagación vegetativa han promovido su expansión en los trópicos hasta ser aceptado universalmente (León 2000). La propagación vegetativa, unida a la interacción de esterilidad-poliploidía-partenocarpia, sólo deja una fuente de variación: las mutaciones somáticas. Algunas mutaciones son de importancia económica; la

resistencia a la enfermedad del Mal de Panamá causado por *Fusarium oxysporum* Schlecht. f. sp. *cubense* (E.F. Smith) Snyder, y Hans, raza tropical 1 (*Foc*, RT1) que se presenta en el grupo de clones de Cavendish (Simmonds 1959; Simmonds 1962; Stover y Simmonds 1987; Soto 1990; León 2000; Ortiz *et al.*, 2001).

El cultivar Gros Michel o Roatán (AAA) es un clon originario de Malasia, cuyo cultivo se extendió por los trópicos americanos, y hasta hace pocos años era el banano de mayor producción: los frutos son grandes y mamelonados en el ápice (León 2000). Por el tamaño del racimo y de los frutos, y sus características de sabor y textura, se le ha reconocido como el tipo por excelencia para comer como fruta. Pero su cultivo disminuye rápidamente, debido a su alta susceptibilidad a la enfermedad del Mal del Panamá (Simmonds 1962; Stover y Simmonds 1987; Soto 1990; León 2000; Ortiz *et al.*, 2001).

Cavendish Enano y Valery (AAA) son los bananos comerciales que están reemplazando a los cultivares de Gros Michel por su tolerancia a la enfermedad del Mal de Panamá. Sus frutos son grandes, de ápice más redondo que el anterior y de calidad comparable (Simmonds 1962; Stover y Simmonds 1987; Soto 1990; León 2000; Ortiz *et al.*, 2001). Pero los cultivares del subgrupo Cavendish (AAA) son susceptibles a la sequia, a la sigatoka negra (*Mycosphaerella fijiensis* Morelet), a fitonematodos (*Pratylenchus goodeyi* Sher y Allen y *Radopholus similis* (Cob) Thorne) y ahora están bajo la amenaza de una nueva variante de la marchitez por *Fusarium* que se extiende en Asia raza tropical 4 (Beed y Markham 2008; Sarah 1989).

Las condiciones óptimas para el cultivo de banano se dan en las regiones tropicales húmedas y cálidas, donde las plantas presentan un crecimiento continuo, cuya inflorescencia aparece cuando se detiene la producción de hojas y raíces (Simmonds 1962; Stover y Simmonds 1987; Soto 1990; León 2000; Ortiz *et al.*, 2001). La luz, la temperatura y la reserva de agua son determinantes, así como un buen contenido de nutrimentos. La planta se sitúa entre los 30° latitud norte y los 30° latitud sur y las mejores condiciones se dan entre los 0 y los 15 grados de latitud norte o sur; y su altitud límite es de 300 msnm, indispensable para su desarrollo y cosecha (Simmonds 1962; Stover y Simmonds 1987; Soto 1990; León 2000; Ortiz *et al.*, 2001).

El centro de origen de los bananos y plátanos es el sureste Asiático e Indochina; diferenciándose por sus caracteres vegetativos y reproductivos (Soto 1990; León 2000; Ortiz *et al.*, 2001; Figura 1). El cultivo de banano se expandió a los trópicos de América, donde la

producción superó a la de su área de origen, a su vez se ha avanzado más en el conocimiento de la genética, fisiología del banano y su producción comercial; de ahí se exportó a Estados Unidos y Europa (Simmonds 1962; Stover y Simmonds 1987; Soto 1990; León 2000; Ortiz *et al.*, 2001).

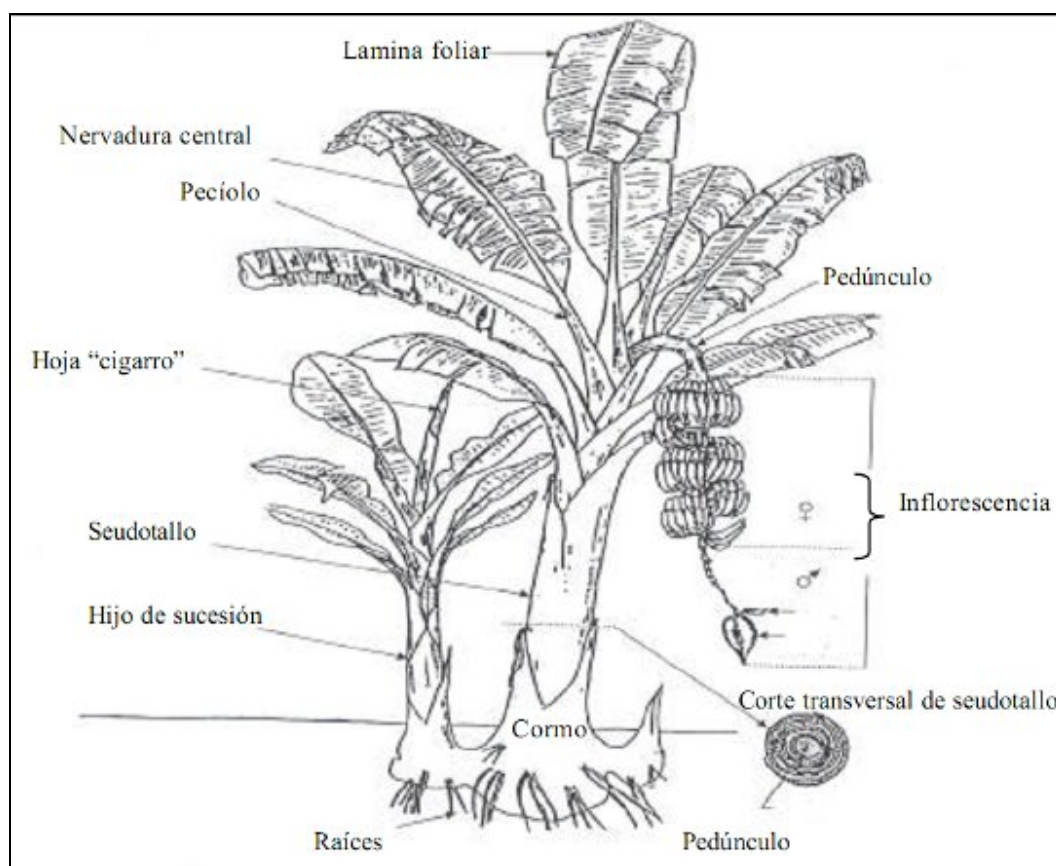


Figura 1. Planta madre de banano, hijo de sucesión e inflorescencia (Champion 1963).

2.2 Importancia del cultivo de banano (*Musa spp.*)

El cultivo de banano se ha establecido en más de 120 países, es el cuarto cultivo alimentario más importante del mundo, después del arroz, el maíz y el trigo; siendo ésta la fruta más exportada del mundo (FAO 2004; FAO 2009). Durante el año 2000 y 2001 se cultivaron 9 millones de hectáreas, con una producción de 92 a 99 millones de toneladas anuales, y en el año 2008 se cosecharon 10 millones de hectáreas, con una producción de 104 millones de toneladas, esto equivale a 4500 y 5000 millones de dólares americanos anuales en comercio internacional (FAO 2004; FAO 2009; IITA 2008).

La industria de banano para exportación se basa principalmente en cultivares del subgrupo Cavendish (AAA). De esta manera el Cavendish suplantó al Gros Michel (AAA) por su resistencia a la enfermedad Mal de Panamá y a su mayor productividad desde el año 1960 (Stover y Simmonds 1987; Soto 1990; FAO 2004). América Latina es la mayor zona exportadora del mundo. Los tres países más destacados son Ecuador, Costa Rica y Colombia (FAO 2004).

Los bananos, contribuyen a la seguridad alimentaria de millones de personas en gran parte del mundo en desarrollo (FAO 2004). En Uganda, el consumo anual en 1996 fue de 243 Kg y en Rwanda, Gabón y Camerún osciló entre 100 y 200 Kg (FAO 2004). Asimismo Brasil y la India dedican gran parte de su producción al autoconsumo; sin obviar que pequeños productores de Latinoamérica cultivan actualmente las variedades susceptibles a Mal del Panamá (*Foc*), estas variedades son el Gros Michel (AAA), el Manzano (AAB), el Prata (AAB) y los bananos de cocción tipo Bluggoe (ABB) cultivándose en asocio con café y cacao representando el mayor ingreso económico de las familias rurales (Pocasangre 2009).

2.3 Distribución del Mal de Panamá e importancia económica

El Mal de Panamá es causado por *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* (*Foc*) siendo una de las enfermedades más destructivas y reconocidas en la historia del cultivo de banano (Stover y Simmonds 1987; Moore *et al.*, 1995; Ploetz 2006; Pocasangre 2009). El Mal de Panamá es procedente del sureste de Asia, y ha coevolucionado junto a las musáceas en sus centro de origen (Bentley *et al.*, 1998).

La enfermedad fue explicada por Bancroft (1876) en Australia (Moore *et al.*, 1995; Pérez-Vicente 2004). Posteriormente, fue reportada en por Ashby en 1913 en América Central. Entre 1890 y 1960 más de 80,000 ha del cultivar Gros Michel (AAA) fueron destruidas en América Latina por la raza tropical 1 de *Foc* (Stover y Simmonds 1987; Pérez-Vicente 2004; Pocasangre y Pérez 2009). Además, el cultivar Cavendish fue afectado en los subtrópicos por *Foc* raza tropical 4, causando pérdidas importantes en plantaciones de Taiwán, China, Filipinas, Norte de Australia, Malasia e Indonesia (Dita *et al.*, 2009; Molina 2009), con pérdidas anuales de más de 75 millones de dólares, afectando los ingresos económicos de miles de trabajadores y agricultores (Dita *et al.*, 2009; Molina 2009). La invasión de *Foc* raza tropical 4 en la plantaciones comerciales del cultivar Cavendish en América Latina y el Caribe

tendría un alto impacto económico y social, comparables con los causados por la raza tropical 1 a mediados del siglo pasado (Pérez-Vicente 2004; Pocasangre y Pérez 2009; Dita *et al.*, 2009; Molina 2009; Lara 2009). Actualmente no existe una variedad resistente y con características comerciales adecuadas para sustituir las variedades del grupo Cavendish, las opciones para el manejo de la raza tropical 4 están centradas en los principios de exclusión y erradicación (Dita *et al.*, 2009). Pero la efectividad de estas medidas depende de un sistema de diagnóstico confiable y específico (Dita *et al.*, 2009). Además, la raza tropical 4 afecta a otros grupos importantes de Musáceas como los plátanos AAB y los bananos de cocción ABB, amenazando la producción de los pequeños agricultores en América Latina, Caribe y en África Occidental (Ploetz 2004). Cabe destacar que al surgir esta amenaza *Bioversity International*, en conjunto con el Organismo Regional Internacional de Sanidad Agropecuaria (OIRSA) y la Red de Investigación y Desarrollo de Plátano y Banano para América Latina y el Caribe (MUSALAC) se han encargado de promover campañas informativas para la prevención de este patógeno en América Latina y el Caribe (Pocasangre 2009).

Según Ploetz y Pegg (2000), la distribución global de la enfermedad se debe a un componente antropocéntrico, debido a que *Foc* fue introducido por medio de rizomas infectados, que con frecuencia no presentan síntomas, para ser utilizado como material de siembra en nuevos terrenos libres de la enfermedad. De acuerdo a Stover (1962) la distribución de la enfermedad está relacionada a nuevos cultivares en áreas de crecimiento. El cultivar Manzano (Silk, AAB) fue introducido en el oeste de la India antes de 1750 como una planta de sombra para las plantaciones de cacao y café, y su presencia indicó el establecimiento de *Foc*. Este aumento de la epidemia del Mal de Panamá se debió a la demanda del cultivar Gros Michel (AAA) para consumo y exportación; esto provocó la pérdida de producción en las plantaciones y la búsqueda de nuevos terrenos de producción, dando origen a un ciclo recurrente de plantaciones por un cierto número de años y luego al abandono del terreno, debido a problemas de *Foc*, esto favoreció la distribución de la enfermedad (Pérez-Vicente 2004).

Smith (1910) y Johnston (1915) reportaron la enfermedad en Cuba; donde los cultivares Gros Michel(AAA), Manzano (AAB) y Burro Criollo (Bluggoe, ABB) estaban gravemente infectados, conllevando a la destrucción de las plantaciones y al reemplazo del cultivar Gros Michel (AAA) por Robusta (subgrupo Cavendish, AAA). Esta conversión resto

importancia económica a la enfermedad del Mal de Panamá y fue confinada a los cultivares Gros Michel (AAA), Manzano (AAB) y Bluggoe (ABB) en parcelas de productores de pequeña escala y en patios de casas (Pérez-Vicente 2004; Pocasangre 2009; Pocasangre y Pérez 2009).

En Africa, *Foc* está localizado en 4 áreas: Islas Canarias, oeste, este y sur de Africa. Con respecto a las Islas Canarias y sur de Africa, *Foc* raza tropical 4 está afectando a Cavendish (AAA). En el oeste, desde Zaire a Ghana está destruyendo cultivos Gros Michel, AAA (Pérez-Vicente 2004). En el este la enfermedad es extendida por la distribución del cultivar Pisang Awak y Bluggoe, ABB (Stover 1962).

El cultivar Gros Michel (AAA) se establece en asocio con sistemas de producción orgánica en cultivos de café, cacao, yuca y árboles forestales en Costa Rica, debido a su preferencia de consumo para todo el país; siendo el Mal de Panamá la principal enfermedad presente en estos sistemas de producción. Asimismo estudios realizados en la región de Turrialba demostraron que el 90% de las fincas que cultivan café en asocio con Gros Michel (AAA) están afectadas por *Foc* y en la zona de Talamanca el 40% de las fincas que cultivan cacao asociado con banano presentaron problemas de *Foc* (Silagyi y Pocasangre 2003). En consecuencia *Bioversity International* en coordinación con la Red de Investigación y de Desarrollo de Plátano y de Banano para América Latina y el Caribe (MUSALAC), Corporación Bananera Nacional de Costa Rica (CORBANA), Instituto de Investigaciones de Sanidad Vegetal de Cuba (INISAV) y la Universidad de Costa Rica (UCR) llevaron a cabo el primer Taller de entrenamiento sobre diagnóstico y caracterización de la Marchitez por *Fusarium* o Mal de Panamá, en Costa Rica, para el fortalecimiento y coordinación entre los sistemas de sanidad vegetal, instituciones de investigación y productores para mantener la raza tropical 4 de *Foc* fuera de la región y preparar las condiciones para su eventual detección, limitación de la diseminación y manejo (Pocasangre *et al.*, 2010; Pocasangre y Pérez-Vicente 2010).

2.4 Descripción de las razas fisiológicas de *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense*

Existen 4 razas definidas de *Foc* relacionadas con las Musáceas (Stover 1962; Stover 1986; Ploetz *et al.*, 2000). La raza 1 está distribuida en las regiones de mayor producción de

banano, siendo patogénica a los cultivares de postre de Silk y Pome (AAB) y Gros Michel, AAA (Stover y Waite 1960; Waite 1977; Stover y Simmonds 1987). La raza 2 ataca a los bananos de cocción tipo Bluggoe y de consumo local, como Chato (ABB), Pisang Awak (ABB), Pome (ABB), Pelipita (ABB) y Saba (ABB) (Stover y Waite 1960; Waite 1977). La raza 3 afecta principalmente a las *Heliconias* spp., (Waite 1977; Stover y Simmonds 1987). La raza 4 ataca a Robusta (subgrupo Cavendish, AAA) y a todos los cultivares susceptibles de la raza 1 y la raza 2 (Stover 1986; Ploetz 1990; Ploetz 1994). En el Cuadro 1 se presentan las 4 razas de *Foc* y los cultivares a cada raza.

Cuadro 1. Razas conocidas de *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* (Stover y Simmonds 1987)

Raza	Variedades atacadas
Raza 1	Gros Michel (AAA), Apple (AAB), Silk (AAB), Taiwán, Latundan (AAB), IC2 (AAA)
Raza 2	Bluggoe (ABB) y tetraploides (AAAA)
Raza 3	<i>Heliconia</i> spp.
Raza 4	Todas las variedades Cavendish (AAA), Taiwán Latundan (AAB), Gros Michel (AAA), Pisang Lilin (AA), Bluggoe (ABB).

2.5 Factores agroclimáticos de *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense*

La supervivencia de *Foc*, así como su crecimiento y esporulación son mayores en suelos de textura fina a francos y franco-arcillosos que en suelos arcillosos pesados con pH 7,2 a 8 (Cárdenas 2001). El micelio y las conidias sobreviven sólo durante poco tiempo en suelos muy secos, punto de partida para el desarrollo de clamidosporas (estructuras reproductivas de sobrevivencia) que se mantienen latentes aproximadamente de 20 a 30 años (Pegg y Langdon 1987; Aguilar *et al.*, 2000; Cárdenas 2001; Pérez y Pocasangre 2010). Se ha documentado que inundaciones por más de 18 meses destruyen las estructuras reproductivas de *Foc* (Ploetz 1989; Ploetz *et al.*, 1989; Ploetz 1990; Ploetz y Pegg 1997; Cárdenas 2001).

2.6 Biología de *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense*

Fusarium oxysporum es una especie compleja compuesta por al menos 70 líneas fitopatógenas hospedantes específicas y un gran número de saprófitos omnipresentes (Pérez y Batlle 2010; Nelson 1981). Snyder y Hasen (1940) desarrollaron el sistema de formas

especiales (f. sp.) (Pérez y Batlle 2010). La especie que causa el Mal de Panamá, se renombró *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* (*Foc*) (Pérez y Batlle 2010). Stover y Waite (1960) y Stover (1962), diferenciaron las poblaciones según su patogenicidad al Gros Michel y Manzano (raza 1), Bluggoe (raza 2) y Cavendish (raza 4 tropical y subtropical) (Pérez y Batlle 2010). *Foc* fue incluido en la sección Elegans (Stover 1962; Nelson 1981; Nelson 1991). Es un patógeno que habita en el suelo con formación de tres esporas asexuales: microconidias, macroconidias y clamidosporas (Nelson 1981; Beckman y Talboy 1990; Nelson 1991; Figura 2). Las microconidias presentan una forma ovalada y están constituidas por una o dos células, mientras que las macroconidias, ligeramente curvadas y relativamente delgadas, en forma de hoz, presentan de 4 a 8 células, tanto las microconidias y las macroconidias se producen sobre cortas monofilides ramificadas o no ramificadas (Nelson 1981; Burgess *et al.*, 1994; Leslie y Summerell 2006). Las clamidosporas son usualmente globosas y se forman individualmente o en pares de hifas o conidias y tienen una doble membrana fuerte (Nelson 1981). Esto le confiere a las esporas estructuras de sobrevivencia del hongo, debido a que pueden permanecer en el suelo durante varios años haciendo imposible volver a sembrar cultivos susceptibles en el mismo lugar (Nelson 1981; Davis 2005).

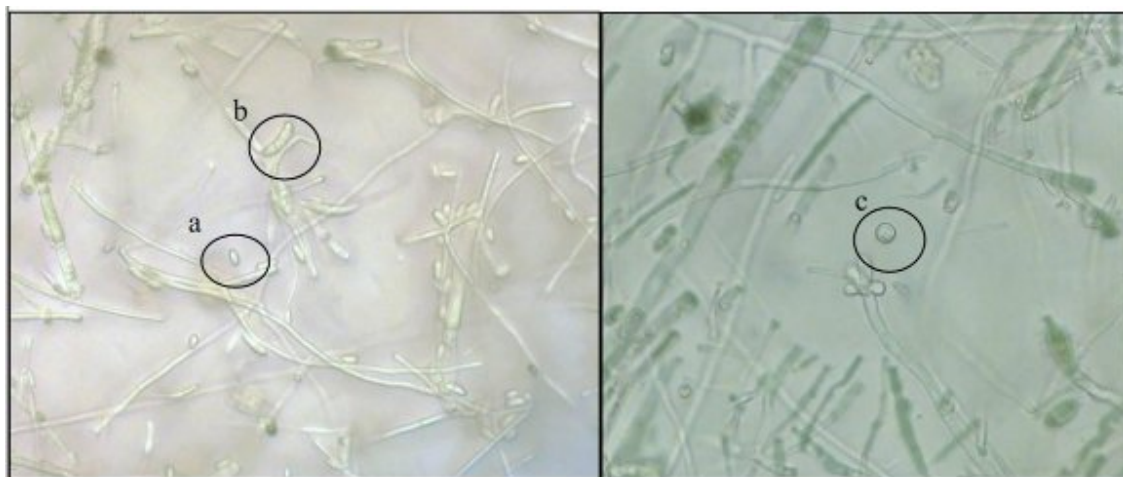


Figura 2. Estructuras reproductivas de *Foc* observadas al microscopio a) microconidias b) macroconidias c) clamidosporas (Lara 2009).

La dispersión de *Foc* es a través de material de propagación infectado, movimiento de residuos de banano y suelos contaminados, herramientas agrícolas, el agua de escorrentía superficial y las raíces de otros hospedantes alternativos (Seshu *et al.*, 1998; Tushemereirwe *et al.*, 1998; Davis 2005; Pérez y Pocasangre 2010). Además, está comprobado que plantas

provenientes de cultivo de tejidos son más susceptibles al ataque del patógeno que plantas de cormos o hijuelos (Smith *et al.*, 1998).

2.7 Infección, epidemiología y ciclo de la enfermedad Mal de Panamá

La invasión de *Foc* en terrenos libres de este patógeno es producto a la diseminación de rizomas y tejidos vegetales infectados, realizados por la actividad humana (Pérez-Vicente 2004).

El patógeno puede permanecer estático en el suelo, como las clamidosporas que son estimuladas a germinar por los exudados de las raíces o por el contacto de tejidos sanos susceptibles (Stover 1962; Pérez-Vicente 2004). El micelio y las conidias se producen después de 6 a 8 horas de germinación de las clamidosporas y se forman nuevas clamidosporas después de 2 a 3 días. La infección toma lugar a través de las raíces absorbentes secundarias y terciarias, pero no de la raíz principal, a menos que haya una herida en el núcleo central de la raíz (Trujillo 1963; Pérez-Vicente 2004). El patógeno pasa a la zona vascular del rizoma en los lugares de inserción de las raíces enfermas, provocando una infección en la corteza y el cilindro central del cormo por la gran cantidad de vasos xilemáticos que se encuentran (Pérez-Vicente 2004). Las conidias se mueven a través de las haces vasculares del pseudotallo provocando una infección, el patógeno se mueve del sistema vascular a la parénquima adyacente en estados avanzados de la enfermedad formando microconidias y clamidosporas que son lanzadas al suelo cuando la planta muere, entrando en dormancia durante varios años (Stover 1962; Pérez-Vicente 2004).

Foc presenta una menor capacidad competitiva que otras especies de hongos comunes en el suelo como *F. solani*, *F. pallidoroseum*, *Rhizoctonia* sp., y *Pythium* sp., (Stover y Waite 1954; Trujillo y Snyder 1963; Pérez-Vicente 2004). Pero la mayor distribución de clamidosporas está en aquellos lugares donde la enfermedad ha radicado, siendo capaz de colonizar el sustrato de las raíces y de esta manera incrementar su crecimiento saprófito y su duración por muchos años en los suelos (Pérez-Vicente 2004). El ciclo de la enfermedad se repite cuando germinan las clamidosporas y hay un crecimiento saprófito en restos vegetales o por la invasión de hospederos (Figura 3).

Foc está confinado a los elementos del xilema, multiplicándose en plantas afectadas; pero algunas conidias son lo suficientemente pequeñas que logran pasar las placas del xilema;

cuando están colonizados los vasos, las conidias se producen durante los próximos 2 a 3 días permitiendo su movimiento y colonización (Pérez-Vicente 2004). La colonización del patógeno en el cultivar Gros Michel se produce sin limitación, pero en los cultivares de Cavendish la colonización es impedida por la acumulación de tílde y gel entre las 24 a 48 horas impidiendo cualquier tipo de colonización (Pérez-Vicente 2004). Según De Ascenso y Dubery (2000) los tejidos de las raíces del cultivar Goldfinger (FHIA 1) son tolerantes a la infección de la raza tropical 4 respondiendo con una fuerte deposición de lignina y el cultivar susceptible Williams responde débil.

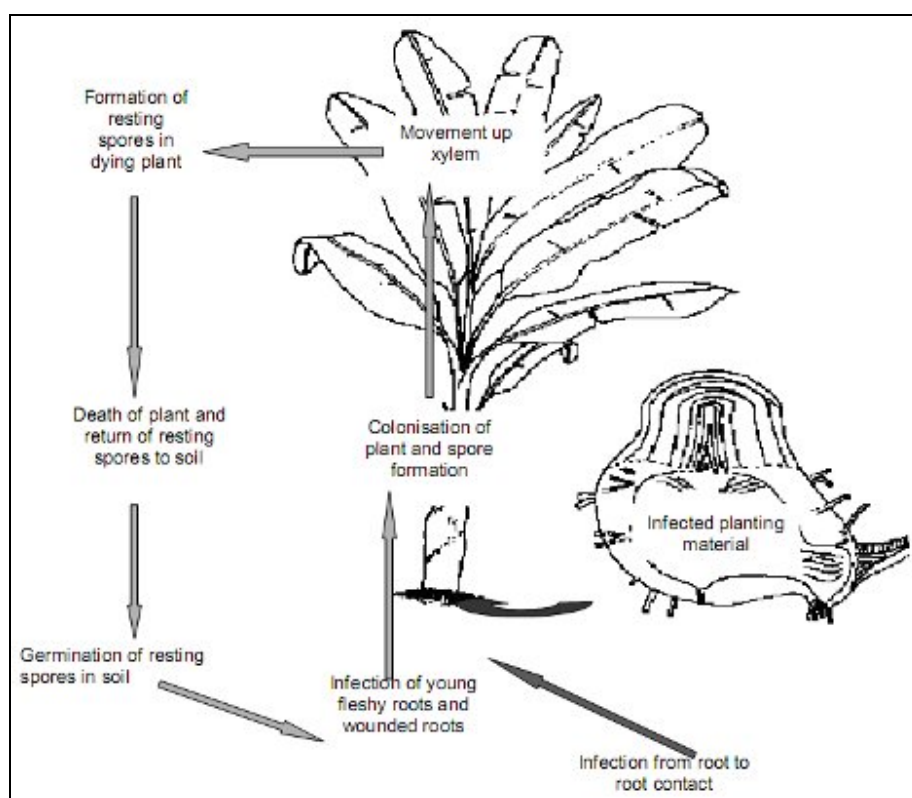


Figura 3. Inicio de la enfermedad y ciclo de vida de *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* en plantas de banano (Daly y Walduck 2006).

2.8 Hospederos alternos de *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense*

Foc puede infectar y colonizar las raíces de las malezas presentes en las plantaciones bananeras, permaneciendo en el suelo durante largo períodos (Pérez-Vicente 2004). Waite y Dunlap (1953) indican obtención de inóculo de *Foc* de raíces estériles de las malezas *Commelina diffusa* Burm. (*C. longicaulis* Jacq), *Paspalum fasciculatum* Willd, *Panicum*

purpurascens Raddi. Su *et al.*, (1986) documentan que aislamientos de *Foc* causan marchitez vascular en plantas de banano, obtenidas de las siguientes malezas *Cyperus iria* L., *Cyperus rotundus* L., *Gnaphalium purpureum* L. y *Fimbristylis koidzumiana* Ohwi.

También Padovan *et al.*, (2003) y Hennessy *et al.*, (2005) obtuvieron aislamientos de *Foc* de una especie monocotiledónea *Chloris inflata* y tres especies dicotiledónea como *Euphorbia heterophylla*, *Tridax procumbens* y *Cyanthilium cinereum* causando marchitez en plantas de banano.

2.9 Síntomas de la enfermedad Mal de Panamá

Foc causa marchitez en la planta, necrosis y pudrición de las raíces, rizomas y vasos del pseudotallo (Pérez-Vicente 2004). Los primeros síntomas son la aparición de estrías verdes pálidas en la base del pecíolo y la decoloración rojiza de los vasos debajo de la epidermis del pecíolo dos semanas antes de iniciar los síntomas típicos. Estos síntomas aparecen entre 2 y 5 meses después de la infección de las raíces (Stover 1962; Pérez-Vicente 2004). A medida que avanza la enfermedad se presenta un amarillamiento de las hojas más viejas a lo largo del margen foliar y continúa hacia la nervadura central hasta quedar completamente seca y de color café (Stover 1959). Todas las hojas se agobian y se marchitan en la unión del pecíolo con el pseudotallo quedando colgadas, los pseudotallos pueden permanecer de pie por 1 o 2 meses (Brandes 1919; Stover 1962). En las plantas con activo crecimiento puede observarse una rajadura del pseudotallo a nivel del suelo (Brandes 1919; Stover 1962; Thurston 1989; Pérez-Vicente 2004; Figura 4). En sus inicios este síntoma se puede confundir con deficiencia de potasio, especialmente bajo condiciones de sequía y frío (Moore *et al.*, 1995).

Los primeros síntomas internos de la enfermedad se producen en las raíces, moviéndose al rizoma en los límites de la corteza y el cilindro central donde hay mayor área vascular, observándose estrías necróticas, oscuras o azuladas sobre un fondo blanco (Wardlaw 1961; Stover 1962; Stover y Simmonds 1987; Figura 4). El patógeno pasa a través de los vasos afectados a nuevos retoños en crecimiento (Ploetz y Pegg 2000; Pérez-Vicente 2004; Figura 4). Las hojas nuevas que emergen del pseudotallo infectado son más cortas de lo normal y no se presentan síntomas internos en los frutos de banano (Pérez-Vicente 2004).

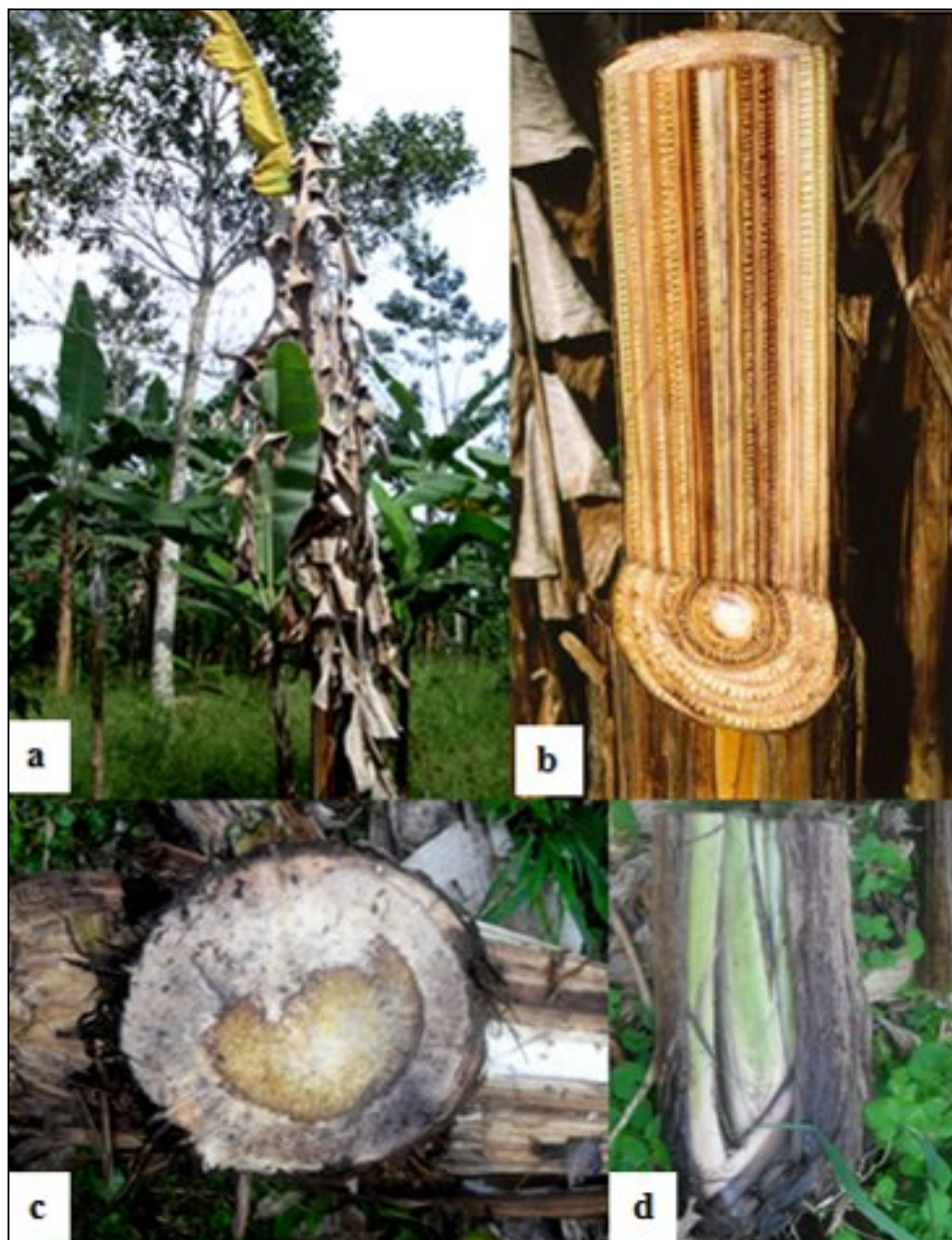


Figura 4. Síntomas externos e internos del Mal de Panamá causados por *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* en el cultivar Gros Michel (AAA), a) Hoja amarillenta en pie y hojas muertas colgando del pseudotallo, b) Corte longitudinal del pseudotallo, presentado una decoloración rojiza-café en sus haces vasculares de las vainas externas (Pocasangre 2009), c) Corte transversal del corno, presentado una decoloración interna rojiza-café en la corteza y el cilindro central, d) Presencia de rajadura de pseudotallo infectado sobre el nivel del suelo.

2.10 Estado actual del manejo del Mal de Panamá

El Mal de Panamá ha sido la enfermedad más destructiva de las musáceas y de difícil manejo ya que no existen medidas de combate químico eficientes contra el patógeno (Laskman *et al.*, 1987; Herbert y Max 1990; Davis *et al.*, 1994; Ploetz y Pegg 2000; Pérez-Vicente 2004; Ploetz 2004; Ploetz 2006). Pocasangre (2009) indica que los productores que siguen cultivando las variedades susceptibles como Gros Michel (AAA), el Manzano (AAB), el Prata (AAB) y los bananos de cocción tipo Bluggoe (ABB) están llevando a cabo una agricultura migratoria, siembras anuales escalonadas y la búsqueda de tierras vírgenes libres del patógeno, pero estas prácticas sólo permiten periodos cortos de siembra ya que el patógeno vuelve a devastar las plantaciones.

Sin embargo, existen prácticas culturales que han evitado el desarrollo y la propagación de la enfermedad en aéreas libres del patógeno, implementando el uso de plantas certificadas provenientes de cultivos de tejidos (Cárdenas 2001; Pérez-Vicente 2004). Todo esto debe estar encaminado a fortalecer el vigor de las plantas y crear condiciones desfavorables para el desarrollo del patógeno en el suelo (Jones 2000). Por medio del uso de antagonistas para la reducción de *Foc* como son cepas no patogénicas de *Fusarium oxysporum* y *Trichoderma* spp., (Pérez *et al.*, 2003); demostrando resultados en el combate biológico del Mal de Panamá y extrayéndose estos antagonistas de suelos supresivos a la enfermedad (Lemanceau *et al.*, 1988; Peng *et al.*, 1999; Mazzola 2002).

Por lo anterior, es importante integrar estas medidas de manejo contra la enfermedad para tener sistemas de producción más sostenibles, permitiéndole a los productores de musáceas mantenerse por periodos más prolongados y con menor incidencia y severidad de la enfermedad (Pocasangre 2008a; Pocasangre 2009).

2.10.1 Prácticas culturales

La integración de las prácticas culturales en un agroecosistema bananero, favorece el monitoreo, detección, prevención y manejo de la enfermedad; siendo efectiva la reducción de pérdidas de los cultivos (Rutherford y Kangire 1998). La obtención de plántulas sanas y libres de la enfermedad procedente de cultivos de tejidos es una estrategia para evitar la diseminación del patógeno, sin embargo, en suelos infectados por *Foc*, las vitroplantas son más susceptibles que las plantas obtenidas de cormos (Smith 1998; Smith *et al.*, 1998). La

erradicación de plantas enfermas y las medidas cuarentenarias son prácticas vitales que impiden el movimiento del material vegetal infectado hacia áreas libres del patógeno (Katan *et al.*, 1983; Rutherford y Kangire 1998; Seshu *et al.*, 1998).

2.10.2 Resistencia genética

Es bien conocido que la resistencia genética en bananos para la marchitez de *Fusarium* es limitada, comparado con otros cultivos importantes (Buddenhagen 1990). Parte del problema es que son cultivos triploides y son diploides sin semillas que están alejados geográficamente de la actividad de los centros de investigación genética (Buddenhagen 1990). Y otro problema es que la “resistencia” es una forma de tolerancia a la marchitez por *Fusarium* (Buddenhagen 1990). Produciéndose infecciones en la raíz, generándose mecanismos de defensa, y por último la clasificación final de resistencia o susceptible. Pero el uso de genotipos resistentes es considerado una estrategia importante para el combate de la enfermedad en las plantaciones bananeras de los trópicos de forma efectiva, económica y práctica a largo plazo para pequeños agricultores en países en desarrollo (Rutherford y Kangire 1998; Ploetz 2006). Esto ha sido por medio de las herramientas biotecnológicas donde se han seleccionado plantas de banano *in vitro* tolerantes al Mal de Panamá (Matsumoto *et al.*, 1999; Morpurgo *et al.*, 1999; Cardenas 2001; Lara 2009). También se han identificado cultivares resistentes, la FHIA (Fundación Hondureña de investigación Agrícola) ha desarrollado diploides superiores SH-3142, SH-3362 y SH 3437 con resistencia a la raza 1 y 2, y SH-3362 resistente a la raza 4, derivado de Pisang lili y Calcutta 4 (Rowe 1990; Vuylsteke y Hartman 1998; Orjeda 1998). Además del cultivar Gros Michel se han derivado dos híbridos tetraploides FHIA-17 y FHIA-23 resistentes a la raza 1; El FHIA-01 (Goldfinger) un tetraploide derivado de Dwarf Prata (AAB) resistente a la raza 1 y 4 (Rowe 1990; Vuylsteke y Hartman 1998; Orjeda 1998). EMBRAPA también ha seleccionado híbridos tetraploides de Prata resistente a la marchitez por *Fusarium*, como PV 03-44 y PA03-22 (Rowe 1990; Vuylsteke y Hartman 1998). Por lo que FHIA-01 y FHIA-03 pueden reemplazar variedades susceptibles en África (Rutherford y Kangire 1998). Además se obtuvieron variedades resistentes por medio de la variación somaclonal en Taiwán siendo Tai-Chiao No1, GCTCV-53, GCTCV-119, GCTCV-44, GCTCV-25-1 (Hwang 2004); importante para el sustento de la población. Pero estos cultivares no tienen aceptación comercial debido a un tiempo muy largo

para la producción e inferioridad del fruto; no presentando la calidad organoléptica de subgrupo Cavendish y mucho menos la del cultivar Gros Michel.

2.10.3 Combate biológico

El combate biológico de las enfermedades se define como la capacidad natural de los suelos de suprimir la enfermedad (Lugtenberg y Leveau 2007). Se llama suelo supresivo a aquel donde está presente un patógeno virulento y un hospedero susceptible, pero no se desarrollan los síntomas de la enfermedad (Alabouvette *et al.*, 1993; Larkin *et al.*, 1996; Alabouvette 1999; Forsyth *et al.*, 2006; Lugtenberg y Leveau 2007).

Sikora (1992) define el término antagonista como un conjunto de microorganismos que actúan como parásitos, predadores, competidores que de alguna manera repelen, inhiben o matan a los nematodos, insectos y hongos fitopatógenos.

Pocasangre (2000) indica que la utilización de microorganismos antagonistas constituye una alternativa para disminuir la incidencia de enfermedades, mejorar la nutrición y la resistencia de las plantas. Hongos y bacterias dentro del género *Gliocladium*, *Verticillium*, *Trichoderma* y *Pseudomonas* son efectivas en la reducción de pérdidas atribuidas a un número de patógenos transmitidos por el suelo, incluyendo la marchitez por *Fusarium* y *Verticillium* (Yamaguchi *et al.*, 1992). Además, la aplicación de agentes de biocontrol en plántulas ha permitido evitar infecciones tempranas en los cultivos (Rutherford y Kangire 1998). El éxito de los agentes de biocontrol es la reducción de poblaciones de patógenos, la cual se da directamente por la competencia por nutrientes o nichos, el parasitismo, o mediante la inducción de resistencia de los hospederos (Rutherford y Kangire 1998).

2.10.4 Hongos endofíticos

Son organismos que viven dentro de los tejidos de las plantas, sin causar síntomas o daños aparentes (Carroll y Petrini 1983; Carroll 1988; Bandara *et al.*, 2006; Shi *et al.*, 2009). Ellos colonizan la mayoría de plantas sanas; considerados como simbioses y mutualistas omnipresentes (Hata *et al.*, 2002), se pueden encontrar en varios tejidos, semillas, raíces, tallos y hojas (Bandara *et al.*, 2006; Shi *et al.*, 2009). Pueden ser extraídos del interior de las plantas o aislados desde la superficie estéril de los tejidos de las plantas (Bandara *et al.*, 2006; Shi *et al.*, 2009). Las plantas se benefician ampliamente por la protección de estos organismos

endofíticos, promoviendo el crecimiento de la planta (Compant *et al.*, 2005) y otorgando un incremento en la resistencia a varios patógenos, por la producción de varios antibióticos y metabolitos secundarios. Esto sugiere que hay presencia de hongos endofíticos mutualistas que actúan como detonantes biológicos para activar los sistemas de defensa ante condiciones adversas bióticas y/o abióticas (Bandara *et al.*, 2006; Shi *et al.*, 2009).

Sikora (1992) y Pocasangre (2000) describen que la mayoría de los hongos endofíticos son ascomicetos y están presentes en gran parte de su ciclo de vida dentro del tejido de la planta, generando un beneficio de protección y promoción de crecimiento.

2.10.5 Endofíticos como agentes de biocontrol de la marchitez por *Fusarium*

Las investigaciones de biocontrol de Mal de Panamá están centradas en el uso de antagonistas endofíticos (Pérez-Vicente 2004).

Mitova y Oliva (1975) reportaron la eficacia del antagonista *Trichoderma harzianum* *in vitro* y la reducción de la infección por *Foc* en plantas de Gros Michel tratadas con el antagonista previo a la inoculación con *Foc* en condiciones controladas. Resultados similares fueron reportados por Pérez *et al.*, (2003) y Pérez *et al.*, (2009) sobre la cepa A34 de *T. harzianum* que mostró una marcada inhibición de la frecuencia y severidad de la enfermedad en plantaciones de Burro CEMSA y FHIA-03 durante cinco años de producción en suelos infectados con *Foc* en Cuba. Sivan y Chet (1987) encontraron que *T. harzianum* redujo la incidencia de *F. oxysporum* f. sp. *radicis lycopersici* en el cultivo de tomate bajo condiciones de campo. Thangavelu *et al.*, (2003) obtuvo aislados de hongos y bacterias antagonistas de la rizosfera del suelo de plantas afectadas por *Foc*, con un alto potencial para producir enzimas hidrolíticas *in vitro*, encontrándose una alta producción de celulosa, chitinasas y β -1, y enzimas 3-glucanasa de *T. harzianum* cepa Th-10, seguida de *Bacillus subtilis* Bs-10 y *T. viride* Tv-1; bajo condiciones de invernadero *T. harzianum* cepa Th-10 redujo la incidencia a 48% y 51% en condiciones de campo seguido de *B. subtilis* Bs-10 y *Pseudomonas fluorescences* con 41%; mostrando su acción de biocontrol. Forsyth *et al.*, (2006) obtuvieron un aislado endofítico de *F. oxysporum* (BRIP 29089) identificado como organismo potencial de biocontrol, reduciendo la severidad de la enfermedad de la marchitez por *Fusarium* en cultivares Lady Finger y Cavendish en condiciones controladas. Borges *et al.*, (2007) indica una reducción de la enfermedad marchitez por *Fusarium* en Maca, variedad de banano (*Musa* sp.) y un incremento en el crecimiento de la planta con inoculaciones previas de hongos

micorrizas arbusculares. Lara (2009) reporta que las bacterias endofíticas F6B25 y F1B9 del género *Bacillus* spp., redujeron en un 65% el crecimiento radial de *Foc* en cocultivos y en pruebas de biocontrol la bacteria endofítica F7B13 retardó la aparición de los síntomas externos de *Foc* en más de tres semanas en comparación de los demás tratamientos.

Nel *et al.*, (2006) indica que los aislados T22 y T5 de *Trichoderma* mostraron inhibición de *Foc in vitro*, pero cepas no patogénicas de *F. oxysporum* no mostraron inhibición del patógeno. En evaluaciones *in vivo*, los aislados no patogénicos de *F. oxysporum* CA255 y CA241 redujeron la enfermedad a 87.45% y 75.0% respectivamente, pero Fo47 no causó ninguna supresión en este estudio, aunque en estudios anteriores se indica su eficacia en la reducción de la enfermedad (Lemanceau *et al.*, 1992; Lemanceau *et al.*, 1994; Fuchs *et al.*, 1997; Duijff *et al.*, 1999). Larkin y Fravel (1998) y Larkin y Fravel (1999) indican que cepas no patogénicas de *F. oxysporum*, incluyendo Fo47, pueden diferir en su eficacia, así como en sus mecanismos de acción para la supresión de la enfermedad. Por otra parte aislamientos de *Pseudomonas flourescens*, WC417 y *Psf* redujeron la severidad de la enfermedad en 87.4% y 83.4% respectivamente (Nel *et al.*, 2006). Recientemente Noreskal (2010) reportó aislamientos de bacterias y hongos endofíticas que inhibieron el crecimiento radial de *Foc* raza 1, en condiciones *in vitro*, al mismo tiempo evaluaciones en invernadero con vitroplantas de Gros Michel (AAA) tratadas con *Foc* e inoculadas previamente con los aislamiento de hongos endofíticos presentaron una reducción significativa de la enfermedad por medio de los índices de síntomas externos e internos, además de la promoción de crecimiento, con respecto a las vitroplantas inoculadas con bacterias endofíticas. Siendo agentes de biocontrol eficaces para el combate de la enfermedad Mal de Panamá.

2.10.6 Interacciones *Trichoderma*-Planta-Patógeno

2.10.6.1 Interacción *Trichoderma*-Patógeno

Trichoderma (Teleomorfo *Hypocrea*) es un género de hongos asexuales presentes en los suelos tropicales y subtropicales (Vinale *et al.*, 2008). Estos hongos son invasores secundarios oportunistas con rápido crecimiento micelial, productores de esporas fuertes, generadores de enzimas degradadoras de pared celular (EDPCs o CWDEs: celulasas, chitinasas, glucanasas), y un importante productor de antibiosis (Vinale *et al.*, 2008). El mecanismo de biocontrol utilizado por *Trichoderma* en una confrontación directa con los

patógenos mediante micoparasitismo y antibiosis (Papavizas 1985; Howell 2003; Vinale *et al.*, 2008).

2.10.6.1.1 Micoparasitismo y enzimas líticas

Los eventos de micoparasitismo son reconocimiento del hospedero, ataque al hospedero, penetración de la pared celular y muerte del hospedero (Vinale *et al.*, 2008). Durante este proceso, *Trichoderma* secreta CWDEs, que hidrolizan la pared celular del hospedero y posteriormente hay liberación de oligómeros desde la pared celular del patógeno (Howell 2003; Woo *et al.*, 2006; Vinale *et al.*, 2008).

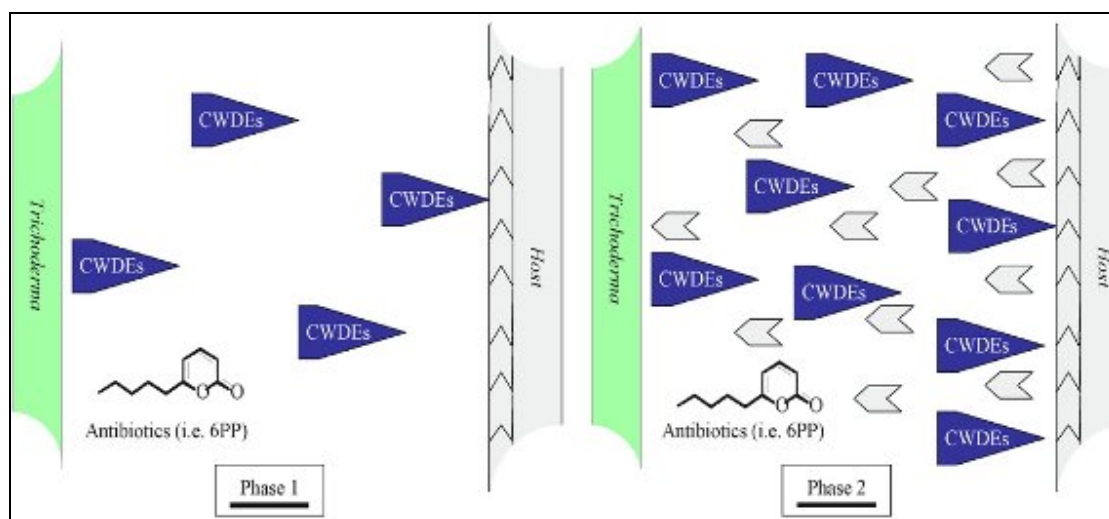


Figura 5. Eventos de pre-contacto de la interacción micoparasítica de *Trichoderma*-hongos hospederos. Fase 1. El micoparásito produce componentes de alto peso molecular que alcanzan al hospedero. Fase 2. Productos degradados de bajo peso molecular que son liberados de la pared celular del hospedero alcanzando al micoparásito y activando los genes de expresión en cascada del micoparásito (Vinale *et al.*, 2008).

Se cree que *Trichoderma* segrega enzimas hidrolíticas con un nivel constituido y detecta la presencia de diferentes hongos por medio de moléculas liberadas desde el hospedero por degradación enzimática (Howell 2003; Harman *et al.*, 2004; Woo & Lorito 2007; Vinale *et al.*, 2008; Figura 5).

2.10.6.1.2 Antibiosis y metabolitos secundarios

Los metabolitos secundarios incluyen grupos heterogéneos de componentes químicos naturales diferentes, relacionados a la supervivencia y funciones producidas por el organismo, tales como competición contra otros micro y macroorganismos, simbiosis, transporte de metales, efecto de diferenciación (Demain y Fang 2000; Vinale *et al.*, 2008); incluyendo en este grupo los antibióticos, capaces de inhibir el crecimiento microbiano y correlacionado con la habilidad de biocontrol y purificación de antibióticos (Vinale *et al.*, 2008).

Según Ghisalberti y Sivasithamparam (1991) clasifican a los metabolitos secundarios según sus componentes químicos en tres categorías: (a) antibióticos volátiles, *p. ej.* 6 pentil- α -pyrone (6PP) y derivados de isocianuro; (b) componentes solubles en agua, *p. ej.* Ácidos heptelídico o ácidos koningico; (c) peptaiboles. Se ha demostrado que este último metabolito de *T. harzianum* inhibe la síntesis de β -glucan de las paredes celulares de los hongos hospederos, por medio de la acción sinérgica de las β -glucanasas (Lorito *et al.*, 1996). Esto se debe a la desintegración de la pared celular de los hongos por medio de las β -glucanasas (Lorito *et al.*, 1996; Vinale *et al.*, 2008).

Según Howell *et al.*, (1993) dividió las especies de *T. virens* en dos grupos. Las especies “Q” capaces de producir antibióticos gliotoxin y las especies “P” que producen antibióticos gliovirin (Howell y Stipanovic 1983). Gliotoxin tiene un amplio espectro de actividad antibiótica, mientras gliovirin es un potente inhibidor específico de Oomycetos, siendo un eficiente biocontrolador de las especies “P” para combate *Pythium* causante de damping-off en algodón (Vinale *et al.*, 2008).

2.10.6.1.3 Competencia de espacio y nutrientes con los patógenos

Las especies de *Trichoderma* compiten por carbono, nitrógeno y otros factores de crecimiento, junto con la competencia de espacios y sitios específicos de infección (Vinale *et al.*, 2008). Estos son mecanismos utilizados por los agentes de biocontrol para reducir las enfermedades de los patógenos. Gullino (1992) reporta que *T. harzianum* es capaz de combatir *B. cinerea* en uvas, por la colonización de tejidos florales y excluir al patógeno desde el sitio de infección. Sivan y Chet (1989) demostraron que la competencia por nutrientes es el mejor mecanismo usado por *T. harzianum* (aislado T35) para el combate de *F. oxysporum* f. sp. *melonis* y *F. oxysporum* f. sp. *vasinfectum*. Por lo que *Trichoderma* presenta una fuerte capacidad de movilizar y tomar los nutrientes de la rizosfera, siendo más eficiente y

competitivo que la mayoría microbios del suelo, con un conjunto de mecanismos que actúan en forma sinérgica en el biocontrol del patógeno (Benítez *et al.*, 2004; Vinale *et al.*, 2008).

2.10.6.2 Interacción *Trichoderma*-planta

Las especies de *Trichoderma* son capaces de colonizar la superficie de las raíces y causar cambios sustanciales en el metabolismo de los tejidos de las plantas promoviendo el crecimiento de las plantas, incrementando la disponibilidad de nutrientes, mejorando la producción de los cultivos y aumentando la resistencia de las enfermedades (Harman *et al.*, 2004; Vinale *et al.*, 2008).

2.10.6.2.1 Colonización de *Trichoderma* spp., en las raíces

El movimiento de las especies de *Trichoderma* en la rizosfera, es por medio de sus hifas en continuo crecimiento que exploran y penetran la corteza de las raíces, colonizando los tejidos de las plantas (Yedidia *et al.*, 1999; Vinale *et al.*, 2008). Esto favorece un nicho nutricional para *Trichoderma* y una simbiosis con la planta al protegerla de las enfermedades. Una reacción biológica a la presencia de *Trichoderma* activa la expresión de los genes de la planta respondiendo con un sistema de defensa, promoviendo el crecimiento de la planta, el sistema radicular y disponibilidad de nutrientes; creando una zona favorable para el biocontrol de patógenos e incrementando el antagonismo (Yadidia *et al.*, 2003; Harman *et al.*, 2004; Hason y Howell 2004).

2.10.6.2.2 Promoción del crecimiento vegetativo en las plantas

Muchos de los agentes de biocontrol no son capaces de reducir el patógeno causante de la enfermedad; pero son capaces de promover el crecimiento y desarrollo vegetativo de las plantas (Vinale *et al.*, 2008). Esto se refleja en estudios llevados a cabo con *T. harzianum* T22 y *T. atroviride* P1 donde se reporta un incremento del crecimiento vegetativo de plantas de lechuga (*Lactuca sativa* L.), tomate (*Lycopersicon esculentum* L.) y chiltoma (*Capsicum annum* L.) (Vinale *et al.*, 2008).

Las especies de *Trichoderma* producen ácidos orgánicos, como el glucónico, ácidos cítricos y fumáricos; estos ácidos disminuyen el pH del suelo y permite la solubilización de fosfatos, micronutrientes y minerales cationes del tipo de hierro, magnesio y manganeso útiles para los metabolitos de la planta (Benítez *et al.*, 2004; Harman *et al.*, 2004; Vinale *et al.*, 2008).

2.10.6.2.3 Mecanismos de defensas generados por la planta

Las plantas han mostrado incremento de su resistencia al ser atacadas por los patógenos, cuando son pre-tratadas con *Trichoderma* (Howell 2003; Harman *et al.*, 2004; Vinale *et al.*, 2008), estimulando los mecanismos de defensa de la planta, como barreras físicas y reacciones bioquímicas (Rivero 2001). Las plantas colonizadas por *Trichoderma* presentan una reducción de la incidencia y la severidad de las enfermedades (Vinale *et al.*, 2008), porque son capaces de inducir una resistencia local adquirida, activada en los sitios de contacto o de inoculación; para transferirla a otras partes de células y tejidos de las plantas, consiguiéndose la inducción de la resistencia sistémica (Rivero 2001; Vinale *et al.*, 2008). Involucrando la producción de proteínas relacionadas a la patogenicidad (quitinasas y β -1,3 glucanasas) (PR proteínas) (Van Loon *et al.*, 1998; Rivero 2001; Harman *et al.*, 2004; Vinale *et al.*, 2008).

Durante la interacción de *Trichoderma* con la planta hay diferentes clases de metabolitos que pueden actuar como estimuladores de la inducción de resistencia (Howell 2003; Harman *et al.*, 2004; Woo *et al.*, 2006; Woo y Lorito 2007; Vinale *et al.*, 2008). Estas moléculas incluyen: (a) proteínas con actividad enzimáticas, como la xilanasa (Lotan y Fluhr 1990); (b) producción de genes avirulentos capaces de inducir una reacción de defensa a la planta; (c) componentes de bajo peso molecular liberados desde el hongo o pared celular de la planta por la actividad de las enzimas de *Trichoderma* (Harman *et al.*, 2004; Woo *et al.*, 2006; Woo y Lorito 2007); (d) componentes de bajo peso molecular producto de la degradación fueron liberados desde la pared celular del patógeno para ser purificado (Woo *et al.*, 2006; Woo y Lorito 2007). Otros metabolitos secundarios importantes, son los peptabolitos que pueden estimular los mecanismos de defensa de la plantas contra los patógenos (Vinale *et al.*, 2008).

3 MATERIALES Y MÉTODOS

3.1 Ubicación geográfica de la investigación

El trabajo de investigación se realizó en el laboratorio de Nematología y Fitopatología del Centro Agronómico Tropical de Investigación y Enseñanza (CATIE), ubicado en el cantón de Turrialba, provincia de Cartago, Costa Rica. Localizado a una latitud de 9°53' norte, longitud de 83°38' oeste y una altitud de 602 msnm. Durante el período de estudio de enero a junio del 2010 se registró una temperatura máxima promedio de 27.3°C y mínima promedio de 19°C, con un promedio de 93% de humedad relativa, una precipitación promedio de 228.7 mm, radiación solar promedio diaria de 16.2 MJ/m² y una evapotranspiración promedio diaria de 2.9 mm; estos datos fueron obtenidos de la estación meteorológica del CATIE.

3.2 Material experimental

3.2.1 Aislamientos de *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense*

Se utilizaron tres aislamientos purificados de *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* (*Foc*) raza 1, para el bioensayo de antibiosis y dos aislamientos para el bioensayo biocontrol, FOC2 y FOC4, por presentar mayor patogenicidad en estudios anteriores (Lara 2009). El aislamiento 2 fue colectado por el Dr. Harry Stover en Talamanca, Costa Rica y suministrado por el Dr. Randy Ploetz de la Universidad de Florida, USA. Los aislamientos 4 y 8 fueron recolectados por Lara (2009) en Turrialba, Costa Rica. En el Cuadro 2 se presentan las características de cada aislamiento de *Foc* evaluado.

Cuadro 2. Caracterización de los aislamientos de *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* evaluados

No	Código de los aislamientos	Clon de origen	Raza	Localidad	Apariencia y pigmentación de colonias
1	FOC 2	Gros Michel	1	Talamanca	Algodonosa y amarillenta
2	FOC 4	Gros Michel	1	Cabiria	Algodonosa y rosada
3	FOC 8	Gros Michel	1	La Montaña	Algodonosa y rosada

3.2.2 Aislamientos de hongos endofíticos de *Trichoderma* spp.

Se utilizaron 50 aislamiento endofíticos del género *Trichoderma* spp., que fueron aislados de los cultivares Cavendish (AAA), provenientes de fincas comerciales de bananos de la Zona Atlántica de Costa Rica (Cuadro 3). Estos aislamientos fueron seleccionados como agentes de biocontrol de fitonematodos en pruebas *in vitro* e *in vivo* realizadas en el Laboratorio de Nematología y Fitopatología del CATIE (Cañizares 2003; Menjivar 2005).

Cuadro 3. Descripción de los aislamientos endofíticos de *Trichoderma* spp., evaluados en esta investigación

Finca	Accesión N°	Código
El Esfuerzo	Val002	TE1
El Esfuerzo	Val003	TE2
El Esfuerzo	Val 008	TE3
El Esfuerzo	Val005	TE4
El Esfuerzo	Val009	TE5
El Esfuerzo	Val011	TE6
El Esfuerzo	Val004	TE7
La Montaña	Val 010	TM1
Cartagena	T-CART-B-O26	TC1
Cartagena	T.CART-B-027	TC2
Cartagena	T.CART-B-028	TC3
Cartagena	T.CART-B-029	TC4
Cartagena	T.CART-B-030	TC5
Cartagena	T.CART-B-032	TC6
Cartagena	T.CART-B-033	TC7
Cartagena	T.CART-B-035	TC8
Cartagena	T.CART-B-036	TC9
Cartagena	T.CART-B-038	TC10
Cartagena	T.CART-B-039	TC11
Cartagena	T.CART-P-042	TC12
Sixaola	END1	TS1
Sixaola	END2	TS2
Duacari	1.6	TD1
Duacari	4.10	TD2
Duacari	2.8	TD3
Duacari	4.8	TD4
Duacari	9.10	TD5
Duacari	1.4	TD6
Duacari	10.13	TD7
Las Juntas	C6T24	TJ1
Las Juntas	C2T26	TJ2
Las Juntas	C6T29	TJ3
Las Juntas	C11T13	TJ4
Las Juntas	C2T25	TJ5
	Val006	TB1

Calinda	077	TCL1
Calinda	087	TCL2
Calinda	093	TCL3
Calinda	094	TCL4
Calinda	095	TCL5
Calinda	096	TCL6
Calinda	099	TCL7
Calinda	100	TCL8
San Pablo	038	TP1
San Pablo	042	TP2
San Pablo	040	TP3
Palo Verde	049	TV1
Palo Verde	052	TV2
Palo Verde	047	TV3
Palo Verde	048	TV4

3.2.3 Material vegetal

Se utilizaron plantas de banano del cultivar Gros Michel (AAA) con once semanas de endurecimiento colectivo en invernadero, provenientes del área de cultivos de tejidos del Laboratorio de Biotecnología del CATIE.

3.3 Cultivo y multiplicación de los aislamientos de *Fusarium oxysporum* f. *sp. cubense*

Se cultivaron colonias puras de los tres aislamientos de *Foc* en PDA al 100%, conservada en crioviales, mediante la extracción aséptica de las perlas impregnadas con estructuras infectivas (microconidias, macroconidias y clamidosporas) de *Foc* raza 1 del cultivar Gros Michel (AAA).

Estas perlas impregnadas con el patógeno fueron transferidas para inocular los platos Petri que contenían el PDA al 100% acidificado, a continuación cada plato fue rotulado, registrado y sellado con *parafilm* en condiciones asépticas en una cámara de flujo laminar horizontal y posteriormente almacenado a 24°C por dos semanas en una incubadora, para el crecimiento y esporulación de las colonias de *Foc*.

Al cabo de este período, se procedió a la multiplicación de los aislamientos 2, 4 y 8 de *Foc*, extrayéndose discos de PDA al 100% de 5 mm de diámetro que contenían micelio, microconidias, macroconidias y clamidosporas, para ser trasladadas a nuevos platos Petri con PDA al 100% acidificado en condiciones asépticas. Estos fueron rotulados, registrados y

sellados con papel *parafilm*. Los platos sembrados con los aislamientos de *Foc* fueron almacenados a 24°C por dos semanas en una incubadora.

3.4 Cultivo y multiplicación de los aislamientos de *Trichoderma* spp.

Las colonias puras de *Trichoderma* spp., fueron cultivadas en PDA al 100% acidificado. El inóculo se obtuvo a partir de colonias conservadas en papel de filtro almacenados en viales eppendorf. Los aislamientos fueron cultivados en platos Petri que contenían PDA al 100% acidificado, cada plato Petri fue rotulado, registrado y sellado con *parafilm* en condiciones asépticas en una cámara de flujo laminar horizontal y posteriormente almacenado a 24°C por una semana en una incubadora, para el crecimiento y esporulación de las colonias de *Trichoderma* spp. Al finalizar este período, se realizó la multiplicación de los *Trichoderma* spp., extrayéndose un disco de PDA de 5 mm de diámetro que contenía micelio y conidias, para ser llevados a nuevos platos Petri con PDA al 100% acidificado en condiciones asépticas, cada plato fue rotulado, registrado y sellado con papel *parafilm* y se almacenó a 24°C por dos semanas en una incubadora.

3.5 Preparación de la suspensión de esporas de *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense*

Cultivos puros de *Foc*, crecidos en PDA al 100% con ácido láctico al 85% y almacenados a 24°C durante 2 semanas en una incubadora, fueron utilizados para la obtención de una suspensión de esporas. A cada plato Petri que contenía los crecimientos de un aislamiento específico de *Foc* se le agregó 20 ml de agua destilada hasta cubrir el cultivo puro. Posteriormente se removieron las esporas y el micelio con una espátula plástica; las suspensiones obtenidas se filtraron por medio de una gasa doble para separar el micelio de las esporas, vertiéndose en un *beaker*, y llevando a un volumen de 100 ml.

Una vez obtenida la suspensión de esporas, se prosiguió al conteo de las unidades formadoras de colonias (ufc) utilizando un hematócmetro de Neubauer en un microscopio Olympus BH2 con aumento de 40x, para luego ajustar la suspensión a una concentración de 1×10^6 ufc/ml (Figura 6).



Figura 6. Protocolo para la preparación de una suspensión de esporas de *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense*.

3.6 Preparación de la suspensión de esporas de los *Trichoderma* spp.

Para la obtención de una suspensión de esporas de los aislamientos de *Trichoderma* se utilizó el mismo protocolo descrito en el numeral anterior.

3.7 Bioensayo 1. Prueba de antibiosis por medio de los cocultivo sobre los tres aislamientos de *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* y hongos endofíticos de *Trichoderma* spp.

Un disco de PDA de 0.5 cm de diámetro conteniendo micelio, microconidios y macroconidios de *Foc*, con dos semanas de crecimiento, fue colocado al extremo de un plato Petri que contenía PDA al 100% acidificado, en condiciones asépticas. Simultáneamente al extremo opuesto se colocó un disco de PDA de 0.5 cm de diámetro, conteniendo micelio y conidias de cincuenta aislamientos endofíticos de *Trichoderma* spp., con dos semanas de crecimiento. Cada plato fue identificado, sellado con papel *parafilm* y almacenado a 24°C por 8 días. Se establecieron tres testigos referenciales que correspondieron al cultivo de los tres aislamientos de *Foc* sin los discos opuestos de *Trichoderma* spp. Se realizaron 3 repeticiones por cada tratamiento (Figura 7).

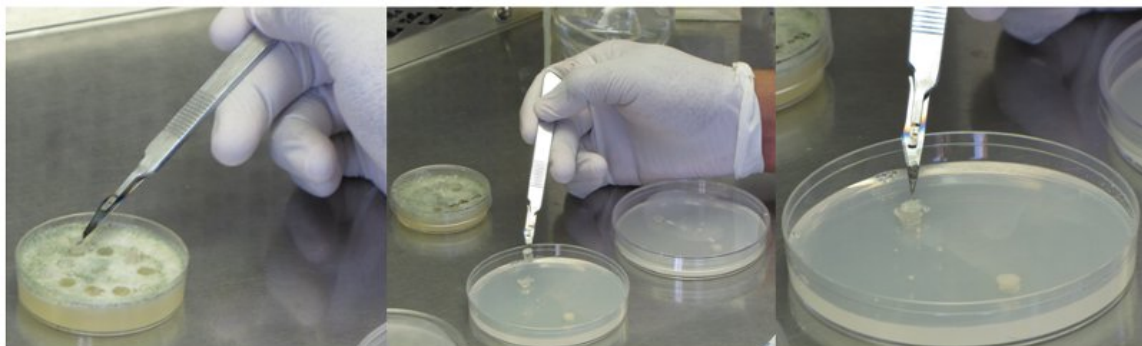


Figura 7. Protocolo para el cocultivo de *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* y hongos endofíticos de *Trichoderma* spp.

3.7.1 Evaluación del crecimiento radial de los aislamientos de *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* y de los hongos endofíticos de *Trichoderma* spp.

El crecimiento de las colonias de *Foc* y de *Trichoderma* spp., fue evaluado cada 24 horas durante un periodo de 8 días, con el uso de una regla graduada en centímetros. En cada plato Petri se midió el crecimiento radial de las colonias de los hongos hacia el lado izquierdo y derecho del centro del disco que las contenía (Figura 8).



Figura 8. Medición del crecimiento radial de las colonias de *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* y *Trichoderma* spp. Después de ocho día de cocultivo.

3.8 Bioensayo 2. Prueba de biocontrol

Para la prueba de biocontrol se seleccionaron 20 aislamientos endofíticos de *Trichoderma* spp., que presentaron el mayor porcentaje de inhibición del crecimiento radical de *Foc*. La prueba consistió en la evaluación de síntomas de la enfermedad Mal de Panamá en vitroplantas de banano del cultivar Gros Michel (AAA), quienes fueron inoculadas con *Foc* y protegidas con los aislamientos de *Trichoderma* spp. Los resultados fueron comparados con plantas testigo absoluto (sin *Foc* y sin *Trichoderma* spp.) y un testigo referencial (sólo *Foc*).

3.8.1 Protección de vitroplantas con hongos endofíticos de *Trichoderma* spp.

Vitroplantas de banano del cultivar Gros Michel (AAA) de 11 semanas de aclimatación en invernadero fueron inoculadas con suspensiones conidiales de los hongos endofíticos con cepas de *Trichoderma* spp., que fueron seleccionados en cocultivos. El sistema radical de las vitroplantas se sumergió en una suspensión de conidias de hongos endofíticos a una concentración 1×10^6 ufc/ml durante 15 minutos. Posteriormente, las vitroplantas fueron trasplantadas en contenedores plásticos de 250 cm³ de capacidad que contenían una mezcla esterilizada de tierra y arena en una relación 1:1. El sustrato se esterilizó mediante vapor saturado a presión en una autoclave con una temperatura de 120 ± 2 °C y 2 atmosferas de presión durante 4 horas. Se realizaron ocho repeticiones por cada tratamiento, estas unidades experimentales se distribuyeron al azar en ocho mesas en el invernadero de Musáceas donde permanecieron 11 semanas a una temperatura 27.3 ± 2 °C (Figura 9).



Figura 9. Protocolo para la protección de vitroplantas de banano con hongos endofíticos de *Trichoderma* spp.

3.8.2 Inoculación de vitroplantas con aislamientos de *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense*

Tres semanas después de la protección de las vitroplantas con los hongos endofíticos de *Trichoderma* spp., se realizó la inoculación con los aislamientos de *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* FOC2 y FOC4 evaluados por Lara (2009). La inoculación se realizó aplicando 5 ml de una suspensión ajustada de FOC a una concentración 1×10^6 ufc/ml en tres agujeros de 1 a 2 cm de profundidad realizado en el sustrato alrededor del área radical y cercana a la base del rizoma, para lo cual se utilizó una pipeta Eppendorf calibrada. Cuatro semanas después se realizó una segunda inoculación de FOC siguiendo el mismo procedimiento.

Se establecieron dos testigos referenciales con inoculación de los dos aislamientos de FOC, sin previa protección de las inoculaciones de los hongos endofíticos de *Trichoderma* spp., además, se estableció un testigo absoluto, con plantas sin inoculación de los aislamientos de FOC y los hongos endofíticos de *Trichoderma* spp.

3.8.3 Evaluación de la incidencia y la severidad de la enfermedad

El periodo de incubación se determinó cuando se presentó la primera planta con síntomas externos característicos de la enfermedad. La incidencia de la enfermedad se calculó por el número de plantas que presentaron síntomas de la enfermedad y se expresó en porcentajes de plantas enfermas. Las evaluaciones se realizaron de manera semanal hasta el término del bioensayo.

La severidad de la enfermedad se evaluó por el grado de daño expresado tanto en síntomas externos como internos, los cuales fueron estimados visualmente según la escala propuesta por Orjeda (1998) (Cuadro 4). Los síntomas externos se evaluaron cada semana después de la primera inoculación con *Foc*. La evaluación de síntomas internos se realizó al finalizar el bioensayo. Las plantas fueron sacrificadas y se realizaron cortes longitudinales a nivel del cormo.

Las variables de crecimiento se midieron cada dos semanas hasta el término del bioensayo, evaluando número de hojas por plantas, altura de plantas, diámetro del pseudotallo, largo y ancho de la tercera hoja, longitud del pecíolo de la tercera hoja e índice foliar. Finalmente se tomó el peso radical, foliar y total de la planta.

Cuadro 4. Escala de evaluación de síntomas provocados por *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense*

Valor	Síntomas externos		Síntomas internos
	Amarillamiento	Marchitez	Decoloración del cormo
1	Ausencia de síntomas	Ausencia de síntomas	Ausencia de síntomas
2	Amarillamiento en hojas viejas	Marchitez en hojas viejas	Puntos aislados de decoloración en el tejido vascular
3	Amarillamiento en hojas bajas	Marchitez en hojas bajas	Decoloración de hasta 1/3 del tejido vascular
4	Amarillamiento las hojas jóvenes	Marchitez en las hojas jóvenes	Decoloración de entre 1/3 y 2/3 del tejido vascular
5	Severo amarillamiento	Severa marchitez	Decoloración mayor a los 2/3 del tejido vascular
6	Muerte de la planta	Muerte de la planta	Decoloración total del tejido vascular

Fuente: Orjeda (1998).

3.9 Métodos estadísticos

Se realizaron Análisis de Varianza para efectos fijos, bajo la óptica de los Modelos lineales generales y mixtos (Di Rienzo *et al.*, 2009) para las variables que se evaluaron en cada uno de los dos bioensayos (Cuadro 5). Se usaron Modelos Mixtos cuando las variables no presentaron varianzas homogéneas entre los tratamientos. Los datos fueron analizados mediante el programa estadísticos InfoStat usando una interfase de la plataforma R (Di Rienzo *et al.*, 2009).

Cuadro 5. Variables evaluadas en los bioensayos de la investigación

Bioensayo	Variables
Prueba de Biocontrol	Incidencia
	Severidad
	Amarillamiento
	Marchitez
	Decoloración del cormo
	Crecimiento de la planta
	Número de hojas
	Altura de la planta
	Diámetro del pseudotallo
	Largo de la tercera hoja
	Ancho de la tercera hoja
	Longitud del pecíolo
	Índice Foliar
Prueba de cocultivo	Peso radical
	Peso foliar
	Peso total
	Crecimiento radial del hongo

3.9.1 Bioensayo 1. Prueba de cocultivo sobre tres aislamientos de FOC

En esta prueba existieron dos factores en estudio con 3 y 51 niveles respectivamente. El primer factor correspondió a los tres aislamientos de FOC que presentaron mayores niveles de agresividad en la prueba de patogenicidad reportado por Lara (2009), mientras que el segundo factor comprendió los 50 hongos endofíticos (Cuadro 3) y un control sin hongos endofíticos.

Se utilizó un diseño completamente aleatorizado con un arreglo factorial 3×51 con tres repeticiones por tratamientos para un total de 459 unidades experimentales. El modelo estadístico para este arreglo factorial fue el siguiente:

$$Y_{ijk} = \mu + F_i + E_j + F_i E_j + \epsilon_{ijk}$$

Donde:

Y_{ijk} = Variable respuesta

μ = Media general

F_i = Efecto del i -ésimo nivel del factor aislamiento de FOC

E_j = Efecto del j -ésimo nivel del factor de los aislamientos de hongos endofíticos
 $F_i E_j$ = Efecto de la interacción de los aislamientos de FOC - hongos endofíticos
 ϵ_{ijk} = Término del error independiente, supuestamente distribuido normal, con media cero y varianza constante

3.9.2 Bioensayo 2. Prueba de biocontrol sobre dos aislamientos de FOC

En la prueba de biocontrol existieron dos factores en estudio con 2 y 20 niveles respectivamente. El primer factor correspondió a los 2 aislamientos de FOC que presentaron mayores niveles de agresividad en la prueba de patogenicidad reportado por Lara (2009); y un segundo factor comprendió los 20 hongos endofíticos de *Trichoderma* spp., que presentaron los mejores resultados en la prueba de cocultivo y dos testigos referenciales sin hongos endofíticos. Adicionalmente se estableció un testigo absoluto que correspondió a plantas sin inoculación de hongo endofíticos ni de los aislamientos de FOC.

Se utilizó un diseño completamente aleatorizado con un arreglo factorial incompleto de 43 tratamientos ((2 de FOC \times 20 hongos) + 2 testigos referenciales + un testigo absoluto) con ocho repeticiones para un total de 344 unidades experimentales.

El modelo estadístico para este arreglo de tratamientos fue el siguiente

$$Y_{ij} = \mu + T_i + \epsilon_{ij}$$

Donde:

Y_{ij} = Variable respuesta en el tratamiento i repetición j
 μ = Media general
 T_i = Efecto del i -ésimo tratamiento
 ϵ_{ij} = Término del error independiente, supuestamente distribuido normal, con media cero y varianza constante

Para estudiar la interacción se tomó en primer lugar la estructura factorial completa, 20 hongos endofíticos por 2 aislamientos de FOC bajo el siguiente modelo:

$$Y_{ijk} = \mu + F_i + B_j + F_i B_j + \epsilon_{ijk}$$

Donde:

Y_{ijk} = Variable respuesta en el tratamiento

μ = Media general

F_i = Efecto del i -ésimo nivel del factor aislamiento de FOC

B_j = Efecto del j -ésimo nivel del factor de los aislamientos de hongos endofíticos

$F_i B_j$ = Efecto de la interacción de los aislamientos de FOC - hongos endofíticos

ε_{ijk} = Término del error independiente, supuestamente distribuido normal, con media cero y varianza constante

Se procedió a realizar porcentaje de la incidencia por medio de las probabilidades calculadas para las diferencias de proporciones pareadas ($p \leq 0,05$) en cada evaluación. Para síntomas externos e internos se realizó un análisis de varianza con LSD Fisher.

Con los datos variables de crecimiento se procedió a registrar las diferencias de la primera evaluación con respecto a la segunda evaluación, así mismo la tercera evaluación se restaba con la primera evaluación, la cuarta evaluación con la primera evaluación y la quinta evaluación con la primera evaluación. Luego estos datos se analizaron por medio de la teoría de los modelos lineales generales y mixtos con una función de heterogeneidad de varianza, y utilizando la prueba LSD Fisher, con medias y errores estándares de los tratamientos ajustados.

El análisis para las variables peso de la planta, peso del follaje y peso de la raíz fueron realizados con ANOVA bajo la teoría de los modelos lineales generales y mixtos usando una función de heterogeneidad de varianza por medio del paquete estadístico InfoStat y su interfase con R.

Se procedió a realizar las correlaciones de la variable respuesta por medio del coeficiente de correlación de Spearman para la variable crecimiento radial del bioensayo prueba de cocultivo, con las variables porcentajes de incidencia, amarillamiento, marchitez y decoloración del corno de los síntomas externos e internos, además de las variables de crecimiento que fueron significativas como la altura de la planta, número de hojas, diámetro del pseudotallo y ancho de la tercera hoja, así mismo los pesos de raíces, pesos de follaje y peso de las plantas que fueron evaluados en el bioensayo biocontrol.

Se realizó un análisis de conglomerado con todos los tratamientos de los aislamientos endofíticos de *Trichoderma* spp., agrupándolos de acuerdo a las variables respuestas de la prueba de biocontrol; por lo que se procedió a transformar todas las variables al intervalo 0 a 1. Para aquellas variables cuyos valores fueron los más bajos se invirtió la escala haciendo 1-variables transformadas.

Para las variables continuas se utilizó el índice de distancia de Euclidea y el método de Ward. A la vez se realizó un análisis de varianza multivariado para corroborar las diferencias significativas entre grupos, después se prosiguió a realizar un análisis de varianza univariado para cada una de las variables, comprobándose el cumplimiento de los tres supuestos, homogeneidad de varianza, normalidad e independencia de los tratamientos.

4 RESULTADOS

4.1 Bioensayo 1. Prueba de antibiosis sobre tres aislamientos de *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense*

El análisis de los resultados registró diferencias significativas para el factor hongos endofíticos ($p < 0,0001$) y el factor FOC ($p < 0,0001$) y la interacción de los dos factores ($p < 0,0001$) donde se presenta un efecto de reducción de crecimiento radial de los tres aislamientos de FOC al enfrentarse con los aislados endofíticos de *Trichoderma* spp. Existieron aislamientos de hongos endofíticos de *Trichoderma* spp., que provocaron menor crecimiento radial para los aislamientos de 2, 4 y 8 de *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense*, en comparación de los testigos que obtuvieron un crecimiento mayor al no enfrentarse con los aislamientos de los hongos endofíticos. Fueron seleccionados los 20 mejores aislamientos endofíticos de *Trichoderma* spp., que menor crecimiento provocaron para los aislados FOC2 y FOC4. Estos aislamientos de hongos endofíticos son TB1, TC2, TD6, TV4, TC8, TCL4, TD7, TS2, TC12, TE5, TD3, TCL2, TV3, TM1, TCL6, TCL1, TC9, TC6, TP3 y TJ5 (Figura 10). Los aislamientos FOC4 y FOC2 presentaron un mayor crecimiento radial al enfrentarse con los hongos endofíticos en los platos Petri, en comparación al aislado FOC8 que presentó un menor crecimiento. Por lo que se procedió a tomar los aislados FOC2 y FOC4 para evaluaciones de biocontrol. El hongo endofítico TB1 inhibió el 53,46 % del crecimiento radial de FOC4, en comparación del testigo FOC4 que creció el 100% con 2,17 centímetros. De igual manera TV3 inhibió el 38,82%; TV4 con 38,16% y TCL4 con 36,85 del crecimiento radial de FOC2, en comparación del testigo FOC2 que creció el 100% con 1,52 centímetros. Siendo éstos los *Trichoderma* spp., que obtuvieron el mayor porcentaje de inhibición de crecimiento radial para los FOC2 y FOC4 en la prueba de cocultivo.

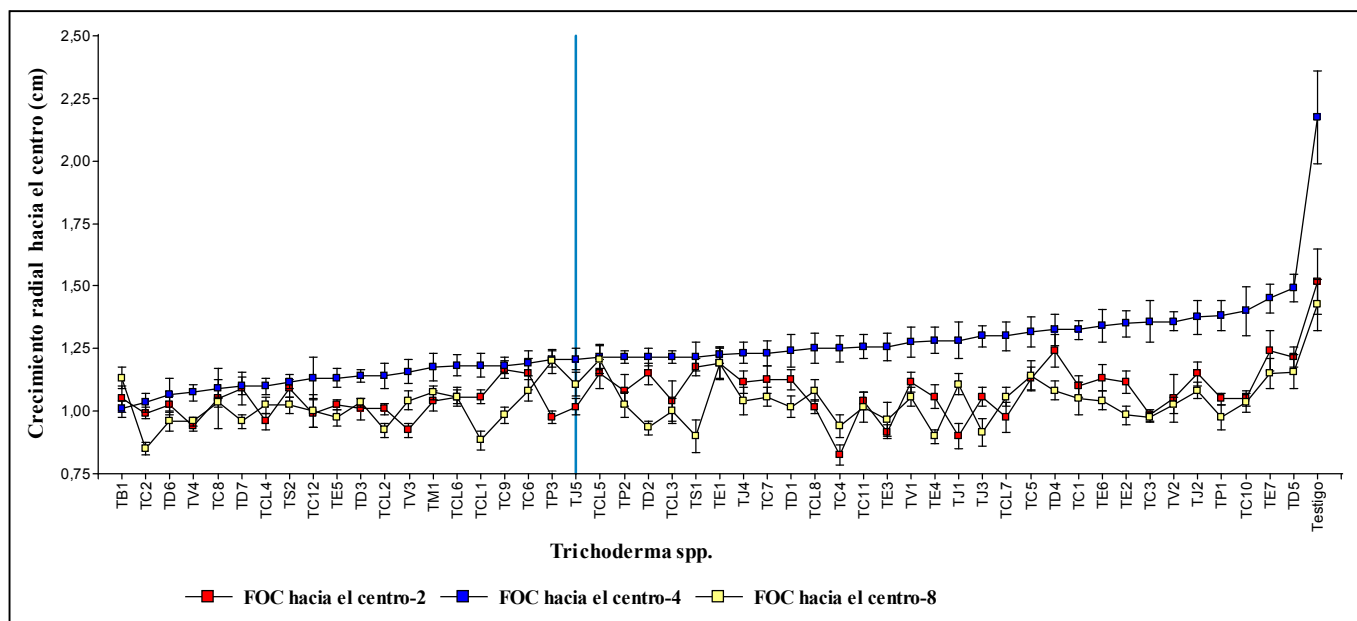


Figura 10. Efecto de hongos endofíticos sobre el crecimiento de *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* en ocho evaluaciones

4.2 Bioensayo 2. Prueba de biocontrol sobre los dos aislamientos de *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense*

4.2.1 Incidencia y severidad de la enfermedad

La incidencia de la enfermedad se empezó a registrar a partir de la tercera semana después de la inoculación con FOC para la mayoría de los tratamientos, con los primeros síntomas externos como el amarillamiento en las hojas adultas. Los tratamientos que fueron inoculados previamente con los hongos endofíticos retardaron la aparición de los síntomas externos de la enfermedad Mal de Panamá en las vitroplantas del cultivar Gros Michel (AAA) en comparación de los testigos referenciales. Los hongos endofíticos retardaron la aparición de los síntomas externos hasta la cuarta semana. El testigo absoluto no presentó síntomas de la enfermedad, debido a que estas no fueron inoculadas con los hongos endofíticos ni con los aislamientos de FOC. Los tratamientos que presentaron incidencia en la cuarta evaluación fueron TB1-FOC2, TB1-FOC4, TC12-FOC2, TC12-FOC4, TC2-FOC2, TC2-FOC4, TC6-FOC2, TC6-FOC4, TC8-FOC2, TC8-FOC4, TC9-FOC2, TC9-FOC4, TCL1-FOC2, TCL1-FOC4, TCL2-FOC2, TCL2-FOC4, TCL6-FOC2, TCL6-FOC4, TD3-FOC2, TD3-FOC4, TD6-FOC2, TD6-FOC4, TD7-FOC2, TD7-FOC4, TE5-FOC2, TE5-FOC4, TJ5-FOC2, TJ5-FOC4,

TM1-FOC2, TM1-FOC4, TP3-FOC2, TP3-FOC4, TS2-FOC2, TS2-FOC4, TV3-FOC2, TV3-FOC4, TV4-FOC2 y TV3-FOC4 (Figura 11).

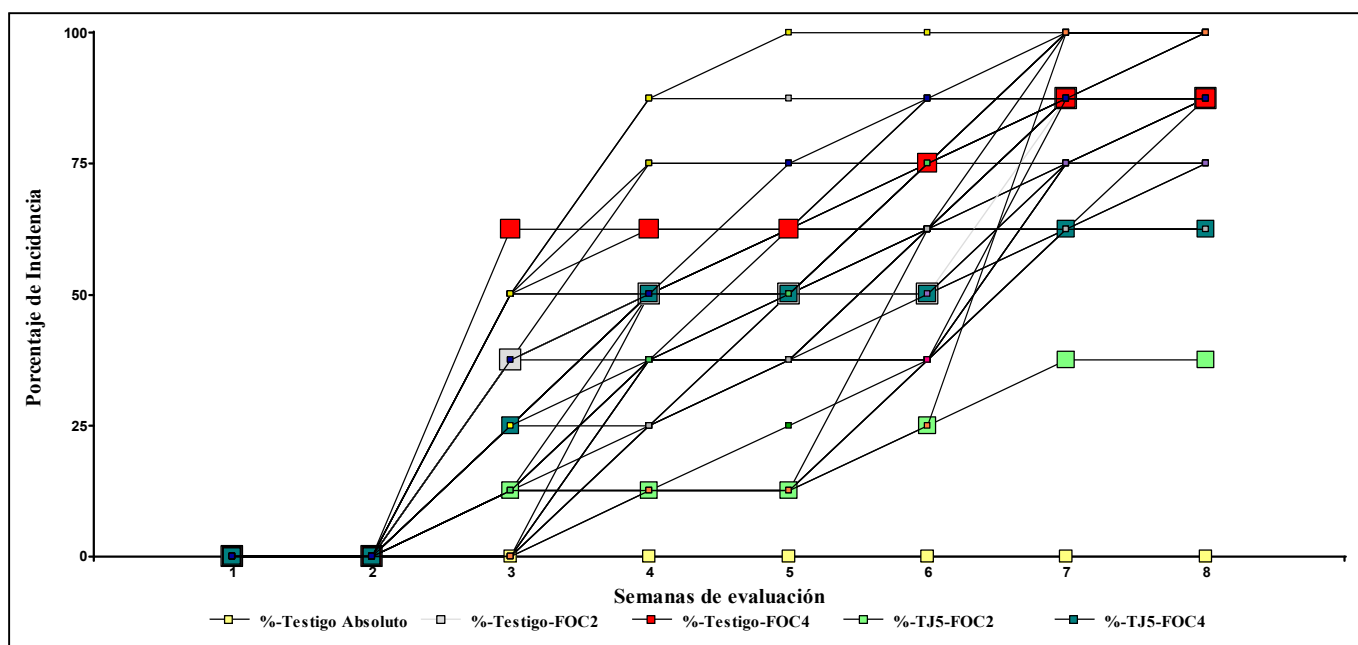


Figura 11. Incidencia del Mal de Panamá con dos aislamientos de *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* en vitroplantas de banana del cultivar Gros Michel (AAA) durante ocho semanas de evaluación.

Con respecto al tratamiento que presentó menor porcentaje de incidencia es TJ5-FOC2, seguido TV3-FCO4, TJ5-FOC4, TD6-FOC4, TCL1-FOC4, TC6-FOC2, TC2-FOC2 y TV1-FOC4 en comparación con el resto de las interacciones y los testigos referenciales. El hongo endofítico TJ5 funcionó para los aislamientos FOC2 y FOC4 encontrando un efecto de reducción de la incidencia en 37,5% y 62,5% (Cuadro 6).

Cuadro 6. Efecto de hongos endofíticos sobre la incidencia del Mal de Panamá en ochos semanas de evaluación

Trichoderma	% Incidencia			
	FOC2		FOC4	
T. abs	0	a		
TJ5	37,5	ab	62,5	bc
TV3	87,5	c	62,5	bc
TD6	87,5	c	62,5	bc
TCL1	87,5	c	62,5	bc
TC6	62,5	bc	87,5	c
TC2	62,5	bc	100	c
TB1	75	bc	62,5	bc
TS2	75	bc	100	c
TP3	87,5	c	75	bc
TE5	87,5	c	75	bc
TCL6	75	bc	100	c
TCL4	75	bc	87,5	c
TV4	100	c	87,5	c
TM1	87,5	c	100	c
T. ref.	87,5	c	87,5	c
TD7	87,5	c	100	c
TD3	100	c	87,5	c
TCL2	100	c	87,5	c
TC9	87,5	c	100	c
TC8	87,5	c	87,5	c
TC12	100	c	100	c

Letras obtenidas a partir de las probabilidades calculadas para la diferencias de proporciones pareadas ($p \leq 0,05$).

En la severidad de los síntomas externos, como amarillamiento y marchitez, los resultados del análisis detectaron diferencias significativas para los tratamientos ($p < 0,0001$) y las evaluaciones ($p < 0,0001$); el tratamiento que menor amarillamiento y marchitez presentó fue TC9-FOC2, seguido de TP3-FOC4 y TCL1-FOC2 en comparación a los testigos referenciales y el testigo absoluto que no presentó síntomas externos de severidad. Obteniendo TC9 una reducción de la enfermedad del 92% en el amarillamiento y marchitez para FOC2, en comparación a los testigos referenciales. Además TP3 y TCL1 redujeron los síntomas externos hasta un 90% para FOC4 y FOC2 respectivamente (Cuadro 7).

Cuadro 7. Efecto de los hongos endofíticos y porcentajes de reducción (entre paréntesis) sobre el amarillamiento y severidad del Mal de Panamá en ocho semanas de evaluación

Amarillamiento			Marchitez	
Trichoderma	FOC2	FOC4	FOC2	FOC4
T.abs.	1(100) ^a		1(100) ^a	
TC9	1,4(92) ^{ab}	1,73(85) ^{bcdef}	1,4(92) ^{ab}	1,71(86) ^{bcdefgh}
TP3	2,58(68) ^{ijklmn}	1,48(90) ^{abc}	2,54(69) ^{lmnopq}	1,45(91) ^{abc}
TCL1	1,52(90) ^{abc}	1,9(82) ^{bcdefgh}	1,52(90) ^{abcd}	1,86(83) ^{bcdefghij}
TC2	1,6(88) ^{bcd}	2,69(66) ^{klmno}	1,58(88) ^{bcde}	2.65(67) ^{nopq}
TV3	2,57(69) ^{ijklmn}	1,63(87) ^{bcde}	2,57(69) ^{mnopq}	1,58(88) ^{bcde}
TD6	1,67(87) ^{bcdef}	1,74(85) ^{bcdef}	1,62(88) ^{bcdef}	1,74(85) ^{bcdefghi}
TV4	1,69(86) ^{bcdef}	3,05(59) ^{nop}	1,69(86) ^{bcdefg}	3,05(59) ^{qrs}
TS2	1,71(86) ^{bcdef}	3,13(57) ^{op}	1,69(86) ^{bcdefgh}	3,04(59) ^{qrs}
TD3	1,73(85) ^{bcdef}	2,13(77) ^{defghij}	1,71(86) ^{bcdefgh}	2,12(78) ^{fghijklmn}
TB1	1,75(85) ^{bcdef}	3,31(54) ^p	1,73(85) ^{bcdefghi}	3,22(56) ^{rs}
TJ5	1,76(85) ^{bcdef}	2,13(77) ^{defghij}	1,74(85) ^{bcdefghi}	2,06(79) ^{efghijklm}
TC8	1,81(84) ^{bcdefg}	2,71(66) ^{lmno}	1,77(85) ^{bcdefghi}	2,67(67) ^{opqr}
TC6	1,98(80) ^{cdefghi}	2,46(71) ^{ijklm}	1,98(80) ^{cdefghijk}	2,46(71) ^{klmnop}
T. ref.	2,07(79) ^{defghij}	3,35(53) ^p	2,02(80) ^{defghijklm}	3,25(55) ^s
TC12	2,21(78) ^{defghij}	2,54(69) ^{ijklmn}	2,02(80) ^{defghijkl}	2,48(70) ^{klmnop}
TM1	2,13(77) ^{defghij}	2,38(72) ^{hijklm}	2,04(79) ^{defghijklm}	2,15(77) ^{fghijklmno}
TCL4	2,31(74) ^{ghijkl}	2,15(77) ^{efghij}	2,25(75) ^{ijklmno}	2,1(78) ^{efghijklm}
TD7	2,17(77) ^{fghijk}	2,17(77) ^{fghijk}	2,17(77) ^{ghijklmno}	2,17(77) ^{ghijklmno}
TCL2	3,25(55) ^p	2,38(72) ^{hijklm}	3,04(59) ^{qrs}	2,23(75) ^{hijklmno}
TCL6	2,4(72) ^{hijklm}	2,58(68) ^{ijklmn}	2,4(72) ^{ijklmnop}	2,52(70) ^{lmnopq}
TE5	2,9(62) ^{mnop}	2,83(63) ^{lmnop}	2,93(61) ^{pqrs}	2,81(64) ^{pqrs}

Datos corresponden al promedio de 6 evaluaciones. Letras distintas indican diferencias significativas ($p \leq 0.05$).

4.2.2 Evaluación de síntomas internos

Para la decoloración del corno no se presentó diferencia significativa para el factor hongos endofíticos ($p < 0,0875$) y el factor FOC ($p < 0,0326$). Y con respecto a las interacciones hongos endofíticos y FOC no se presentó interacción ($p < 0,4441$). Siendo los hongos endofíticos TC9, TD3, TD6, TC12, TCL1, TC8, TJ5, TC2, TCL4, TP3, TD7, TC6 y TS2 los que presentaron menores niveles de decoloración, en comparación al resto de los tratamientos.

Sobresaliendo TC9 con 74% en la reducción de la decoloración del cormo en comparación de los demás tratamientos. (Cuadro 8).

Cuadro 8. Efecto de los hongos endofíticos y porcentajes de reducción (entre paréntesis) sobre la decoloración del cormo de vitroplantas del banano del cultivar Gros Michel (AAA) en la prueba de biocontrol

Trichoderma	Decoloración del cormo
TC9	2,31(74) ^a
TD3	2,56(69) ^{ab}
TD6	2,64(67) ^{abc}
TC12	2,7(66) ^{abc}
TCL1	2,71(66) ^{abc}
TC8	2,75(65) ^{abc}
TJ5	2,87(63) ^{abcd}
TC2	2,88(62) ^{abcde}
TCL4	2,94(61) ^{abcde}
TP3	2,95(61) ^{abcde}
TD7	3,16(57) ^{abcde}
TC6	3,25(55) ^{abcde}
TS2	3,36(53) ^{abcde}
TV4	3,36(53) ^{bcde}
TCL6	3,39(52) ^{bcde}
TB1	3,48(50) ^{cde}
TV3	3,55(49) ^{cde}
TCL2	3,57(49) ^{cde}
TM1	3,75(45) ^{de}
TE5	3,93(41) ^e

Letras distintas indican diferencias significativas ($p \leq 0.05$). Las letras son raíz cuadrada.

4.2.3 Variables de crecimiento

Hubo diferencias significativas en la variable altura de la planta en las evaluaciones dos, tres, cinco y seis, evaluadas cada 15 días. Sin embargo no hubo diferencias significativas

para la evaluación cuatro. Con respecto a la variable número de hojas hubo diferencias significativas para las mediciones tres, cinco y seis, pero no fueron significativas para las evaluaciones dos y cuatro. En la variable diámetro del pseudotallo hubo diferencias significativas para las evaluaciones dos y tres. Sin embargo para la evaluaciones cuatro, cinco y seis no hubo diferencias significativas. En la variable ancho de la tercera hoja hubo diferencias significativas en las evaluaciones dos, tres y cuatro. Pero no así en las evaluaciones cinco y seis.

Las variables que no presentaron diferencias significativas en sus evaluaciones son: largo de la tercera hoja, longitud del pecíolo e índice foliar.

El hongo endofítico TCL6 incrementó la altura a 4,58 centímetros, en comparación al testigo absoluto y los testigos referenciales de *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense*, al cabo de la sexta evaluación. Seguido de los hongos endofíticos TC2, TCL1, TC12, TM1, TC6 y TD6 que presentaron un aumento de la altura al cabo de las seis evaluaciones en las plantas de banano de Gros Michel (AAA). Los hongos endofíticos TCL6 y TC2 mostraron efecto sobre el aislado FOC2 al incrementar la altura en el bioensayo biocontrol (Cuadro 9).

Existieron hongos endofíticos que incrementaron el número de hojas en las plantas de banano del cultivar Gros Michel (AAA) realizadas bajos condiciones de invernadero. Estos hongos endofíticos son TV3, TP3, TD7, TD6, TS2 y TC8 superiores a los testigos referenciales y testigo absoluto (Cuadro 10).

Aislamientos endofíticos de *Trichoderma* spp., incrementaron el diámetro del pseudotallo en las plantas de banano en el cultivar Gros Michel (AAA) bajo condiciones de invernadero. Estos hongos endofíticos son TP3, TB1, TC8, TV3 y TV4 que son mayores que TD3, TD7 y TCL6 y estos superiores a los testigos referenciales y testigo absoluto (Cuadro 11).

Hubo aislamientos endofíticos de *Trichoderma* spp., que aumentaron el ancho de la tercera hoja en las plantas de banano en el cultivar Gros Michel (AAA) bajo condiciones de invernadero. Los hongos endofíticos son TC2, TP3 y TCL4 superiores a testigos referenciales y testigo absoluto. El hongo endofítico TCL4 tiene un efecto sobre los dos aislados de *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* (Cuadro 12).

Cuadro 9. Evaluaciones de la variable altura (cm) realizadas durante las once semanas en vitroplantas de banano durante el ensayo de biocontrol bajo condiciones de invernadero

Evaluación 2		Evaluación 3		Evaluación 4		Evaluación 5		Evaluación 6	
Tratamiento	Altura	Tratamiento	Altura	Tratamiento	Altura	Tratamiento	Altura	Tratamiento	Altura
TCL6-FOC2	1,93 a	TCL6-FOC2	3,10 a	TCL6-FOC2	3,47	TCL6-FOC2	4,10 a	TCL6-FOC2	4,58 a
TCL1-FOC2	1,50 ab	TC2-FOC2	2,63 ab	TC2-FOC2	2,55	TC2-FOC2	2,79 ab	TC2-FOC2	2,41 b
TC12-FOC2	1,30 abc	TCL1-FOC2	1,86 abc	TC2-FOC4	2,13	TD6-FOC2	2,13 bc	TD6-FOC2	2,23 bc
TCL1-FOC4	1,25 abcd	TC2-FOC4	1,64 bcd	TCL1-FOC2	1,90	TCL1-FOC2	1,96 bc	TCL1-FOC2	2,21 bc
TC2-FOC2	1,20 abcde	TD6-FOC2	1,43 bcde	TC12-FOC2	1,73	TP3-FOC4	1,96 bc	TC2-FOC4	2,09 bc
TM1-FOC2	1,13 abcdef	TC12-FOC2	1,40 bcde	TD6-FOC2	1,69	TC2-FOC4	1,93 bc	TV3-FOC4	1,96 bcd
TC6-FOC4	1,13 abcdef	TC8-FOC2	1,30 bcdef	TC8-FOC4	1,49	TC8-FOC4	1,87 bcd	TV3-FOC2	1,88 bcde
TD6-FOC4	1,04 abcdefg	TJ5-FOC4	1,23 cdef	TC6-FOC4	1,34	TC8-FOC2	1,75 bcd	TC8-FOC4	1,83 bcde
TC2-FOC4	0,84 bcdefgh	TCL1-FOC4	1,17 cdef	TCL1-FOC4	1,29	TC12-FOC4	1,68 bcd	TP3-FOC4	1,79 bcde
TJ5-FOC2	0,70 bcdefghi	TCL6-FOC4	1,16 cdef	TJ5-FOC4	1,25	TC6-FOC2	1,65 bcde	TB1-FOC2	1,71 bcde
TJ5-FOC4	0,69 bcdefghi	TV3-FOC4	1,13 cdef	TD6-FOC4	1,21	TC12-FOC2	1,57 bcde	TV4-FOC2	1,69 bcde
TC8-FOC4	0,68 bcdefghi	TC9-FOC2	1,04 cdefg	TV4-FOC4	1,21	TV4-FOC2	1,56 bcde	TCL6-FOC4	1,58 bcdef
TD3-FOC4	0,63 bcdefghi	T.-FOC4	0,90 cdefgh	TC12-FOC4	1,20	TC6-FOC4	1,51 bcde	TD3-FOC2	1,55 bcdef
TC8-FOC2	0,61 bcdefghi	TD7-FOC2	0,86 cdefgh	TV3-FOC4	1,20	TCL4-FOC2	1,50 bcde	TC6-FOC2	1,43 bcdef
TB1-FOC2	0,53 bcdefghi	TCL2-FOC2	0,80 cdefghi	TP3-FOC4	1,16	TV3-FOC2	1,48 bcde	TS2-FOC4	1,42 bcdef
TD3-FOC2	0,46 bcdefghij	T. abs.	0,79 cdefghi	TCL6-FOC4	1,14	TV3-FOC4	1,46 bcde	TC12-FOC4	1,39 bcdef
TCL2-FOC2	0,46 bcdefghij	TC6-FOC4	0,79 cdefghi	TC9-FOC2	1,14	TJ5-FOC4	1,43 bcde	T. abs.	1,36 bcdef
TS2-FOC2	0,44 bcdefghij	TD3-FOC2	0,76 cdefghi	TD7-FOC4	1,09	TD3-FOC2	1,35 bcde	TJ5-FOC4	1,31 bcdef
T. abs.	0,43 bcdefghij	TB1-FOC2	0,75 cdefghi	TD3-FOC2	1,05	T. abs.	1,33 bcde	TC8-FOC2	1,31 bcdef
TD6-FOC2	0,41 cdefghij	TM1-FOC2	0,73 cdefghi	TCL4-FOC2	1,04	TV4-FOC4	1,25 bcde	TD6-FOC4	1,29 bcdef
TE5-FOC4	0,41 cdefghij	TP3-FOC2	0,66 cdefghi	TCL2-FOC2	1,01	TS2-FOC4	1,24 bcde	TD7-FOC2	1,20 bcdef
TCL4-FOC2	0,40 cdefghij	TJ5-FOC2	0,65 cdefghi	TC8-FOC2	0,95	TD7-FOC4	1,20 bcde	TV4-FOC4	1,20 bcdef
TV3-FOC2	0,40 cdefghij	TC12-FOC4	0,64 cdefghi	TS2-FOC4	0,91	TD7-FOC2	1,17 bcde	TC12-FOC2	1,13 bcdef
TV4-FOC2	0,29 cdefghijk	TC6-FOC2	0,63 cdefghi	TP3-FOC2	0,85	TCL1-FOC4	1,13 bcde	TC9-FOC4	1,09 bcdef
TV3-FOC4	0,29 cdefghijk	TD6-FOC4	0,61 cdefghi	TD7-FOC2	0,85	TCL6-FOC4	1,11 bcde	TD7-FOC4	1,07 bcdef
TCL6-FOC4	0,28 cdefghijk	TC9-FOC4	0,56 cdefghi	T.-FOC4	0,85	TB1-FOC2	1,04 bcde	TM1-FOC2	1,00 bcdef
TS2-FOC4	0,26 cdefghijk	TP3-FOC4	0,54 cdefghi	TCL4-FOC4	0,84	TE5-FOC4	1,03 bcde	TC9-FOC2	0,98 bcdef
T.-FOC4	0,19 defghijk	TD7-FOC4	0,53 cdefghi	T. abs.	0,81	TD6-FOC4	1,00 cde	TM1-FOC4	0,80 bcdefg
TD7-FOC4	0,19 defghijk	TS2-FOC2	0,50 cdefghi	TE5-FOC4	0,77	TM1-FOC2	0,94 cde	TS2-FOC2	0,79 bcdefg
TC6-FOC2	0,19 defghijk	TCL4-FOC2	0,50 cdefghi	TC9-FOC4	0,75	TJ5-FOC2	0,93 cde	TE5-FOC4	0,76 bcdefg
TC12-FOC4	0,12 efghijk	TM1-FOC4	0,49 cdefghi	TM1-FOC2	0,75	TD3-FOC4	0,90 cde	TP3-FOC2	0,75 bcdefg
TV4-FOC4	0,06 fghijk	TS2-FOC4	0,48 cdefghi	TB1-FOC4	0,74	TM1-FOC4	0,84 cde	TJ5-FOC2	0,72 bcdefg
TD7-FOC2	0,05 fghijk	T.-FOC2	0,40 defghi	TM1-FOC4	0,74	TS2-FOC2	0,83 cde	TCL4-FOC2	0,71 bcdefg
TC9-FOC2	0,03 ghijk	TCL4-FOC4	0,40 defghi	TV4-FOC2	0,70	TP3-FOC2	0,83 cde	TCL2-FOC2	0,62 bcdefg
T.-FOC2	0 ghijk	TV4-FOC4	0,37 defghi	TB1-FOC2	0,63	TB1-FOC4	0,72 cde	TCL1-FOC4	0,56 bcdefg
TC9-FOC4	0 hijk	TD3-FOC4	0,25 defghi	TJ5-FOC2	0,56	T.-FOC4	0,70 cde	TD3-FOC4	0,55 bcdefg
TP3-FOC4	0 hijk	TV4-FOC2	0,24 efghi	TD3-FOC4	0,55	TC9-FOC4	0,61 cde	TB1-FOC4	0,50 bcdefg
TM1-FOC4	0 hijk	TE5-FOC4	0,21 efghi	TC6-FOC2	0,50	TCL4-FOC4	0,59 cde	TCL4-FOC4	0,45 cdefg
TP3-FOC2	0 hijk	TV3-FOC2	0,17 efghi	TCL2-FOC4	0,31	TCL2-FOC2	0,52 cde	TE5-FOC2	0,25 cdefg
TCL2-FOC4	0 ijk	TCL2-FOC4	0 fghi	TV3-FOC2	0,30	TE5-FOC2	0,40 cde	T.-FOC4	0 defg
TE5-FOC2	0 ijk	TE5-FOC2	0 ghi	TS2-FOC2	0,24	TC9-FOC2	0,13 def	TC6-FOC4	0 efg
TB1-FOC4	0 jk	TB1-FOC4	0 hi	T.-FOC2	0,13	TCL2-FOC4	-0,05 ef	TCL2-FOC4	0 fg
TCL4-FOC4	0 k	TC8-FOC4	0 i	TE5-FOC2	0,09	T.-FOC2	-1,54 f	T.-FOC2	0 g

Letras distintas indican diferencias significativas ($p \leq 0.05$).

Cuadro 10. Evaluaciones de la variable número de hojas realizada en la prueba de biocontrol en plantas de banano del cultivar Gros Michel (AAA) bajo condiciones de invernadero

Evaluación 2		Evaluación 3		Evaluación 4		Evaluación 5		Evaluación 6	
Tratamiento	No. hoj.	Tratamiento	No. hoj.	Tratamiento	No. hoj.	Tratamiento	No. hoj.	Tratamiento	No. hoj.
TCL2-FOC2	1,00	TV3-FOC4	1,63 a	TV3-FOC4	1,63	TD7-FOC2	1,43 a	TS2-FOC4	0,20 a
TD7-FOC2	0,88	TP3-FOC4	1,57 ab	TD6-FOC4	1,57	TD6-FOC4	1,43 a	TC8-FOC4	0,17 a
TCL4-FOC2	0,88	TC9-FOC4	1,38 abc	TC8-FOC4	1,43	TE5-FOC4	1,33 ab	TE5-FOC4	0,00 ab
TV4-FOC4	0,75	TJ5-FOC4	1,25 abcd	TP3-FOC4	1,43	TV3-FOC2	1,33 ab	TP3-FOC4	0,00 ab
TP3-FOC2	0,75	TS2-FOC4	1,25 abcd	TD3-FOC2	1,38	TP3-FOC4	1,29 ab	TJ5-FOC2	0,00 ab
TJ5-FOC4	0,75	TCL6-FOC4	1,25 abcd	TS2-FOC2	1,29	TV4-FOC2	1,25 ab	TD6-FOC4	0,00 ab
TC2-FOC2	0,63	TC2-FOC4	1,25 abcd	TD7-FOC2	1,25	TC6-FOC2	1,17 abc	TC9-FOC2	-0,13 ab
TCL6-FOC2	0,63	TC8-FOC4	1,00 abcde	TC9-FOC4	1,13	TS2-FOC4	1,14 abc	TV4-FOC2	-0,14 ab
TS2-FOC4	0,63	TE5-FOC4	1,00 abcde	TC8-FOC2	1,13	TC9-FOC2	1,00 abc	T.-FOC2	-0,17 abc
TD3-FOC2	0,63	TV4-FOC4	1,00 abcde	TS2-FOC4	1,00	TV3-FOC4	1,00 abc	TV3-FOC4	-0,25 abc
TV4-FOC2	0,63	TD6-FOC4	1,00 abcde	TB1-FOC2	1,00	TCL6-FOC2	1,00 abcd	TCL4-FOC2	-0,29 abc
TV3-FOC4	0,63	TM1-FOC4	1,00 abcde	TP3-FOC2	0,88	TC8-FOC4	1,00 abcd	TM1-FOC2	-0,29 abc
TC8-FOC4	0,63	TCL4-FOC4	0,88 abcde	TC2-FOC2	0,88	TD3-FOC2	1,00 abcd	TM1-FOC4	-0,29 abc
TE5-FOC4	0,63	TCL1-FOC4	0,86 abcdef	TV4-FOC2	0,88	TD6-FOC2	1,00 abcd	TC6-FOC2	-0,33 abc
T.-FOC2	0,63	TC12-FOC4	0,75 abcdef	TD6-FOC2	0,86	TB1-FOC2	0,88 abcd	TC6-FOC4	-0,33 abc
TP3-FOC4	0,63	TD3-FOC4	0,75 abcdef	TV4-FOC4	0,86	TM1-FOC2	0,86 abcd	TC8-FOC2	-0,38 abc
TC8-FOC2	0,63	TCL2-FOC4	0,75 abcdef	TE5-FOC4	0,86	TS2-FOC2	0,86 abcd	TC9-FOC4	-0,38 abc
TC9-FOC4	0,63	TB1-FOC4	0,71 abcdefg	TJ5-FOC4	0,75	TC9-FOC4	0,75 abcd	TC2-FOC2	-0,38 abc
TC9-FOC2	0,63	TC9-FOC2	0,63 bcdefg	TC2-FOC4	0,75	TC8-FOC2	0,75 abcd	TV3-FOC2	-0,40 abc
T.-FOC4	0,50	TD7-FOC4	0,63 bcdefg	TM1-FOC2	0,75	TCL1-FOC2	0,75 abcd	TD7-FOC4	-0,43 abc
TC12-FOC4	0,50	TC8-FOC2	0,63 bcdefg	TC6-FOC2	0,71	TM1-FOC4	0,75 abcd	TD7-FOC2	-0,43 abc
TC2-FOC4	0,50	TCL1-FOC2	0,63 bcdefg	TCL1-FOC4	0,71	TJ5-FOC4	0,71 abcd	TJ5-FOC4	-0,57 abcd
TV3-FOC2	0,50	TD3-FOC2	0,63 bcdefg	TV3-FOC2	0,71	TD7-FOC4	0,57 abcde	TCL6-FOC2	-0,60 abcde
TCL6-FOC4	0,50	TP3-FOC2	0,50 cdefg	TCL1-FOC2	0,63	TC6-FOC4	0,57 abcde	TCL4-FOC4	-0,63 abcde
TM1-FOC4	0,50	TCL4-FOC2	0,50 cdefg	TM1-FOC4	0,63	TJ5-FOC2	0,50 abcdef	TV4-FOC4	-0,67 abcde
TB1-FOC4	0,50	TC6-FOC4	0,50 cdefg	TC6-FOC4	0,57	TC2-FOC2	0,50 abcdef	TCL1-FOC4	-0,71 abcde
TD6-FOC4	0,38	TB1-FOC2	0,50 cdefg	TCL4-FOC4	0,50	TCL1-FOC4	0,43 abcdef	TD6-FOC2	-0,71 abcde
TD6-FOC2	0,38	TC2-FOC2	0,38 defg	TB1-FOC4	0,40	T.-FOC2	0,29 abcdef	TE5-FOC2	-0,75 abcde
TCL4-FOC4	0,38	TD7-FOC2	0,38 defg	TD3-FOC4	0,38	TCL6-FOC4	0,25 abcdef	T. abs.	-0,75 abcde
TC12-FOC2	0,38	TV3-FOC2	0,29 defg	TC9-FOC2	0,38	T.-FOC4	0,20 abcdef	TCL1-FOC2	-0,75 abcde
TC6-FOC4	0,38	TV4-FOC2	0,25 efg	TCL6-FOC4	0,38	TC12-FOC2	0,14 abcdef	TCL2-FOC2	-0,80 abcde
TB1-FOC2	0,25	TM1-FOC2	0,25 efg	TCL4-FOC2	0,25	TCL4-FOC2	0,13 abcdef	TB1-FOC2	-0,86 abcde
TM1-FOC2	0,25	T.-FOC4	0,25 efg	TCL6-FOC2	0,14	TCL4-FOC4	0,00 abcdef	TS2-FOC2	-0,86 abcde
TD7-FOC4	0,25	TJ5-FOC2	0,25 efg	TC12-FOC2	0,13	TV4-FOC4	0,00 abcdef	TD3-FOC2	-0,88 abcde
TCL1-FOC4	0,25	TE5-FOC2	0,00 efg	TJ5-FOC2	0,13	T. abs.	-0,13 bcdef	TP3-FOC2	-1,00 abcde
TC6-FOC2	0,25	T.-FOC2	0,00 efg	TD7-FOC4	0	TCL2-FOC2	-0,17 bcdef	TCL6-FOC4	-1,17 bcde
T. abs.	0,25	TC6-FOC2	0,00 efg	T.-FOC2	0	TC2-FOC4	-0,25 cdef	T.-FOC4	-1,20 bcde
TE5-FOC2	0,25	TS2-FOC2	0,00 efg	T. abs.	0	TP3-FOC2	-0,38 cdef	TC2-FOC4	-1,25 cde
TCL1-FOC2	0,25	TD6-FOC2	0,00 efg	TCL2-FOC2	0	TC12-FOC4	-0,38 cdef	TC12-FOC2	-1,29 cde
TCL2-FOC4	0,13	TCL2-FOC2	0 fg	TC12-FOC4	0	TB1-FOC4	-0,40 cdef	TB1-FOC4	-1,50 cde
TS2-FOC2	0	TCL6-FOC2	0 f	TE5-FOC2	0	TE5-FOC2	-0,43 def	TD3-FOC4	-1,63 de
TD3-FOC4	0	T. abs.	0 g	T.-FOC4	0	TCL2-FOC4	-0,75 ef	TC12-FOC4	-1,71 e
TJ5-FOC2	0	TC12-FOC2	0 g	TCL2-FOC4	0	TD3-FOC4	-0,88 f	TCL2-FOC4	-1,75 e

Letras distintas indican diferencias significativas ($p \leq 0,05$).

Cuadro 11. Evaluaciones de la variable diámetro del pseudotallo (cm) realizada en la prueba de biocontrol en plantas de banano del cultivar Gros Michel (AAA) bajo condiciones de invernadero

Evaluación 2		Evaluación 3		Evaluación 4		Evaluación 5		Evaluación 6	
Tratamiento	D. pseud.	Tratamiento	D. pseud.	Tratamiento	D. pseud.	Tratamiento	D. pseud.	Tratamiento	D. pseud.
TP3-FOC2	1,89 a	TV3-FOC4	2,74 a	TB1-FOC2	3,43	TB1-FOC2	4,1	TB1-FOC2	4,11
TB1-FOC2	1,89 a	TV4-FOC4	2,68 ab	TP3-FOC2	3,33	TC12-FOC2	3,83	TD7-FOC2	3,4
TC8-FOC2	1,63 ab	TCL6-FOC4	2,44 abc	TP3-FOC4	3,15	TCL2-FOC2	3,8	TD6-FOC2	3,4
TD3-FOC2	1,53 abc	TP3-FOC4	2,44 abcd	TC8-FOC4	2,92	TP3-FOC2	3,79	TD3-FOC2	3,26
TP3-FOC4	1,48 abc	TB1-FOC2	2,40 abcd	TD6-FOC4	2,85	TC8-FOC4	3,72	TJ5-FOC2	3,26
TD7-FOC2	1,46 abc	TC8-FOC4	2,38 abcd	TD3-FOC2	2,84	TE5-FOC4	3,71	TC8-FOC2	3,24
TCL6-FOC4	1,38 abcd	TP3-FOC2	2,22 abcde	TCL2-FOC2	2,69	T.-FOC4	3,57	TP3-FOC2	3,16
TC12-FOC2	1,36 abcde	TC2-FOC2	2,14 abcde	TCL4-FOC2	2,68	TP3-FOC4	3,56	TC6-FOC2	3,07
TC9-FOC4	1,36 abcde	TD3-FOC2	2,06 abcdef	TD6-FOC2	2,64	TV3-FOC4	3,56	TC9-FOC2	2,99
TCL2-FOC2	1,34 abcde	TD3-FOC4	2,03 abcdef	TS2-FOC2	2,62	TD6-FOC2	3,54	TE5-FOC2	2,92
TD7-FOC4	1,15 abcdef	TD7-FOC4	1,99 abcdef	TV4-FOC2	2,60	TD3-FOC2	3,53	TP3-FOC4	2,85
TC12-FOC4	1,11 abcdef	TD7-FOC2	1,96 abcdef	T.-FOC2	2,55	TC6-FOC2	3,47	T.-FOC2	2,85
TD6-FOC2	1,08 abcdef	TC8-FOC2	1,93 abcdef	TCL6-FOC4	2,54	TD7-FOC4	3,45	TS2-FOC2	2,82
TCL1-FOC2	1,04 abcdefg	TCL4-FOC4	1,90 abcdef	TV3-FOC4	2,53	TCL6-FOC4	3,4	TV3-FOC4	2,78
TD3-FOC4	1,04 abcdefg	TJ5-FOC4	1,85 abcdefg	TD7-FOC2	2,53	TC8-FOC2	3,33	TCL1-FOC2	2,76
TCL4-FOC2	0,99 abcdefg	TD6-FOC2	1,81 abcdefgh	TC6-FOC2	2,53	TV4-FOC4	3,32	TV3-FOC2	2,76
TS2-FOC2	0,98 abcdefg	TS2-FOC4	1,81 abcdefgh	TCL4-FOC4	2,52	TCL4-FOC2	3,3	TCL6-FOC4	2,76
TV3-FOC2	0,91 abcdefg	TCL4-FOC2	1,80 abcdefgh	TCL1-FOC2	2,51	TCL1-FOC2	3,26	TE5-FOC4	2,75
TC2-FOC2	0,86 abcdefgh	TCL1-FOC2	1,76 abcdefgh	TD3-FOC4	2,48	TD7-FOC2	3,24	TM1-FOC2	2,74
T. abs.	0,84 abcdefgh	TD6-FOC4	1,75 abcdefghi	TC9-FOC2	2,45	TC9-FOC2	3,23	TC12-FOC2	2,74
T.-FOC2	0,80 abcdefgh	TM1-FOC4	1,71 abcdefghi	TD7-FOC4	2,44	TD6-FOC4	3,23	TCL4-FOC2	2,73
TE5-FOC2	0,79 abcdefgh	TE5-FOC4	1,70 abcdefghi	TC9-FOC4	2,34	TV4-FOC2	3,11	TB1-FOC4	2,69
TCL1-FOC4	0,79 abcdefgh	TC2-FOC4	1,69 bdefgghi	TS2-FOC4	2,33	TCL4-FOC4	3,07	TV4-FOC2	2,61
TM1-FOC2	0,77 abcdefgh	TC12-FOC4	1,66 bdefgghi	TM1-FOC4	2,32	TV3-FOC2	3,07	TD7-FOC4	2,58
TC9-FOC2	0,75 bdefggh	TC9-FOC4	1,61 bdefgghi	TE5-FOC2	2,31	TB1-FOC4	3,06	TCL2-FOC2	2,53
TV4-FOC2	0,73 bdefggh	T.-FOC2	1,55 cdefghij	TC8-FOC2	2,26	TM1-FOC4	3,06	TS2-FOC4	2,52
TCL6-FOC2	0,73 bdefggh	TCL1-FOC4	1,53 cdefghij	TJ5-FOC4	2,26	TD3-FOC4	3,06	TC8-FOC4	2,51
TCL4-FOC4	0,68 bdefggh	TC6-FOC2	1,51 cdefghij	TC12-FOC2	2,20	TS2-FOC4	3,04	TM1-FOC4	2,5
TC6-FOC2	0,65 bdefggh	TJ5-FOC2	1,46 cdefghij	TC2-FOC2	2,19	TJ5-FOC4	2,98	TD6-FOC4	2,46
TS2-FOC4	0,61 bdefggh	TC9-FOC2	1,45 cdefghij	T. abs.	2,17	TC9-FOC4	2,97	T. abs.	2,4
TC2-FOC4	0,56 bdefggh	TS2-FOC2	1,40 cdefghij	TCL1-FOC4	1,97	TJ5-FOC2	2,95	TD3-FOC4	2,4
TJ5-FOC2	0,55 bdefggh	TV4-FOC2	1,36 defghij	TJ5-FOC2	1,94	TC2-FOC4	2,92	TCL4-FOC4	2,34
TC8-FOC4	0,54 bdefgghi	T. abs.	1,31 efghij	TE5-FOC4	1,92	TM1-FOC2	2,87	T.-FOC4	2,34
TE5-FOC4	0,51 bdefgghi	TM1-FOC2	1,30 efghij	TC2-FOC4	1,90	TS2-FOC2	2,82	TJ5-FOC4	2,33
TM1-FOC4	0,43 cdefghi	TCL2-FOC4	1,26 efghij	TV4-FOC4	1,85	TCL1-FOC4	2,66	TCL6-FOC2	2,12
TJ5-FOC4	0,30 defghi	TCL2-FOC2	1,23 efghij	TCL2-FOC4	1,85	T. abs.	2,63	TV4-FOC4	2,09
TV4-FOC4	0,24 efghi	TC12-FOC2	1,21 efghij	TB1-FOC4	1,78	TC2-FOC2	2,46	TCL1-FOC4	2,09
T.-FOC4	0,11 fghi	T.-FOC4	1,07 eghij	TM1-FOC2	1,78	T.-FOC2	2,41	TC2-FOC2	2,05
TB1-FOC4	0,06 fghi	TB1-FOC4	0,80 ghij	TC6-FOC4	1,69	TC6-FOC4	2,33	TC9-FOC4	1,89
TD6-FOC4	-0,06 ghi	TV3-FOC2	0,69 hij	T.-FOC4	1,67	TCL6-FOC2	2,28	TCL2-FOC4	1,7
TCL1-FOC4	-0,06 ghi	TE5-FOC2	0,68 ij	TCL6-FOC2	1,63	TE5-FOC2	2,06	TC6-FOC4	1,7
TV3-FOC4	-0,24 hi	TCL6-FOC2	0,66 ij	TC12-FOC4	1,62	TC12-FOC4	2,05	TC12-FOC4	1,64
TC6-FOC4	-0,59 i	TC6-FOC4	0,50 j	TV3-FOC2	1,41	TCL2-FOC4	2,03	TC2-FOC4	1,56

Las letras distintas indican diferencias significativas ($p \leq 0,05$).

Cuadro 12. Evaluaciones de la variable ancho de la tercera hoja (cm) realizada en la prueba de biocontrol en plantas de banano del cultivar Gros Michel (AAA) bajo condiciones de invernadero

Evaluación 2		Evaluación 3		Evaluación 4		Evaluación 5		Evaluación 6	
Tratamiento	A. t. hoj.	Tratamiento	A. t. hoj.	Tratamiento	A. t. hoj.	Tratamiento	A. t. hoj.	Tratamiento	A. t. hoj.
TC2-FOC4	1,93 a	TP3-FOC4	2,80 a	TCL4-FOC2	3,12 a	T. abs.	3,72	TV3-FOC4	11,56
TP3-FOC4	1,65 ab	TC2-FOC4	2,41 ab	TCL4-FOC4	3,09 a	TC2-FOC4	2,93	TC6-FOC2	6,83
TD7-FOC4	1,41 abc	TC2-FOC2	2,28 abc	TC2-FOC2	2,94 ab	TP3-FOC2	2,86	TD7-FOC2	6,24
T.-FOC2	1,36 abcd	TCL4-FOC4	2,21 abcd	TC2-FOC4	2,75 abc	TC2-FOC2	2,80	TCL2-FOC4	5,46
TCL4-FOC4	1,34 abcde	TCL4-FOC2	2,16 abcde	TB1-FOC4	2,73 abcd	TCL4-FOC4	2,79	TCL4-FOC2	4,88
TC9-FOC2	1,33 abcde	TC9-FOC2	2,09 abcdef	TP3-FOC4	2,66 abcd	TCL2-FOC2	2,78	TC12-FOC4	4,68
TD7-FOC2	1,31 abcde	TD7-FOC4	2,05 abcdef	TD6-FOC2	2,53 abcd	TCL4-FOC2	2,70	TC12-FOC2	4,62
TC2-FOC2	1,28 abcdef	TP3-FOC2	2,04 abcdef	TD7-FOC4	2,51 abcde	TC9-FOC2	2,59	TP3-FOC4	4,60
TP3-FOC2	1,18 abcdefg	TB1-FOC4	2,02 abcdef	TC9-FOC2	2,40 abcdef	TV3-FOC2	2,58	TE5-FOC4	4,58
TB1-FOC4	1,14 abcdefgh	TD6-FOC2	1,90 abcdefg	TD6-FOC4	2,39 abcdefg	TCL6-FOC2	2,52	TV4-FOC4	4,18
TC8-FOC4	1,03 bcdefgh	TD7-FOC2	1,89 abcdefg	TV3-FOC4	2,38 abcdefg	TD6-FOC2	2,49	TC9-FOC2	4,09
TJ5-FOC4	1,01 bcdefgh	TD6-FOC4	1,87 abcdefg	TE5-FOC4	2,36 abcdefg	TB1-FOC4	2,47	TD7-FOC4	4,07
TC6-FOC2	0,97 bcdefghi	TC12-FOC2	1,84 abcdefg	TC12-FOC4	2,31 abcdefg	TD6-FOC4	2,44	TCL6-FOC4	3,93
T.-FOC4	0,95 bcdefghi	TV3-FOC4	1,71 bcdefgh	TP3-FOC2	2,25 abcdefg	TP3-FOC4	2,43	TD3-FOC2	3,92
TD3-FOC2	0,93 bcdefghi	TC8-FOC2	1,68 bcdefghi	TC12-FOC2	2,20 abcdefgh	TV4-FOC4	2,38	TV4-FOC2	3,88
TV3-FOC2	0,93 bcdefghi	TV3-FOC2	1,67 bcdefghi	TC8-FOC2	2,19 abcdefgh	TE5-FOC4	2,32	TJ5-FOC4	3,73
T. abs.	0,91 bcdefghi	TJ5-FOC4	1,63 bcdefghi	TC6-FOC4	2,17 abcdefgh	TD7-FOC2	2,29	TC6-FOC4	3,58
TD6-FOC4	0,90 bcdefghi	TC6-FOC2	1,62 bcdefghi	TC6-FOC2	2,17 abcdefgh	TD7-FOC4	2,27	TD3-FOC4	3,55
TC9-FOC4	0,90 bcdefghi	TD3-FOC2	1,60 bcdefghi	TD7-FOC2	2,13 abcdefgh	TV3-FOC4	2,23	TB1-FOC2	3,50
TV4-FOC4	0,89 bcdefghi	TCL6-FOC4	1,59 bcdefghi	TD3-FOC2	2,10 abcdefgh	TV4-FOC2	2,05	T.-FOC2	3,38
TCL2-FOC2	0,75 cdefghi	T. abs.	1,59 bcdefghi	TV3-FOC2	2,08 abcdefgh	T.-FOC2	2,03	TC2-FOC2	3,33
TC8-FOC2	0,75 cdefghi	TS2-FOC4	1,58 bcdefghi	TB1-FOC2	2,06 bcdefgh	TB1-FOC2	2,01	TM1-FOC2	3,09
TCL6-FOC4	0,74 cdefghi	TC9-FOC4	1,55 bcdefghi	TC8-FOC4	2,01 bcdefgh	TD3-FOC2	2,00	TC2-FOC4	2,94
TC12-FOC2	0,73 cdefghi	TV4-FOC4	1,49 bcdefghi	TCL2-FOC2	2,00 bcdefgh	TC12-FOC2	1,97	TV3-FOC2	2,88
TV3-FOC4	0,73 cdefghi	TM1-FOC4	1,48 cdefghi	T.-FOC2	2,00 bcdefgh	TC8-FOC4	1,97	TD6-FOC4	2,83
TE5-FOC2	0,73 cdefghi	TCL1-FOC4	1,47 cdefghi	TCL1-FOC4	1,96 cdefgh	TC12-FOC4	1,93	TD6-FOC2	2,56
TV4-FOC2	0,71 cdefghi	TCL1-FOC2	1,40 cdefghi	TCL1-FOC2	1,93 cdefgh	T.-FOC4	1,90	TP3-FOC2	2,56
TE5-FOC4	0,71 cdefghi	TC8-FOC4	1,40 cdefghi	TE5-FOC2	1,88 cdefgh	TM1-FOC2	1,89	T. abs.	2,52
TS2-FOC4	0,71 cdefghi	TC12-FOC4	1,37 cdefghi	TV4-FOC2	1,88 cdefgh	TC6-FOC4	1,85	TCL6-FOC2	2,48
TCL1-FOC4	0,69 cdefghi	T.-FOC4	1,35 defghi	TM1-FOC2	1,86 cdefgh	TCL1-FOC2	1,85	TS2-FOC4	2,35
TB1-FOC2	0,68 cdefghi	TS2-FOC2	1,30 defghi	TC9-FOC4	1,85 cdefgh	TC9-FOC4	1,84	TCL4-FOC4	2,31
TCL1-FOC2	0,68 cdefghi	TD3-FOC4	1,30 defghi	T. abs.	1,81 cdefgh	TC6-FOC2	1,83	TB1-FOC4	2,23
TC12-FOC4	0,65 cdefghi	TV4-FOC2	1,28 defghi	TJ5-FOC4	1,81 cdefgh	TC8-FOC2	1,74	T.-FOC4	2,00
TD3-FOC4	0,65 cdefghi	TM1-FOC2	1,26 efghi	TCL6-FOC2	1,80 cdefgh	TJ5-FOC4	1,74	TC8-FOC4	2,00
TM1-FOC4	0,61 defghi	TB1-FOC2	1,23 efghi	TCL6-FOC4	1,73 defgh	TCL1-FOC4	1,69	TCL2-FOC2	1,90
TCL6-FOC2	0,60 defghi	TCL2-FOC2	1,21 efghi	TV4-FOC4	1,70 defgh	TCL6-FOC4	1,66	TCL1-FOC4	1,78
TC6-FOC4	0,60 defghi	T.-FOC2	1,17 efghi	TD3-FOC4	1,64 defgh	TE5-FOC2	1,55	TE5-FOC2	1,78
TM1-FOC2	0,58 efghi	TCL6-FOC2	1,17 efghi	TS2-FOC2	1,63 defgh	TD3-FOC4	1,46	TCL1-FOC2	1,75
TS2-FOC2	0,53 fghi	TJ5-FOC2	1,14 fghi	TCL2-FOC4	1,58 efgh	TS2-FOC2	1,44	TM1-FOC4	1,72
TD6-FOC2	0,53 fghi	TC6-FOC4	1,13 fghi	TJ5-FOC2	1,56 efgh	TJ5-FOC2	1,43	TJ5-FOC2	1,65
TCL4-FOC2	0,47 ghi	TCL2-FOC4	1,03 ghi	TS2-FOC4	1,51 fgh	TM1-FOC4	1,36	TC9-FOC4	1,59
TJ5-FOC2	0,38 hi	TE5-FOC2	0,86 hi	TM1-FOC4	1,49 gh	TS2-FOC4	1,33	TC8-FOC2	1,39
TCL2-FOC4	0,24 i	TE5-FOC4	0,80 i	T.-FOC4	1,31 h	TCL2-FOC4	1,15	TS2-FOC2	1,32

Letras distintas indican diferencias significativas ($p \leq 0,05$).

4.2.4 Medición de las variables peso foliar, peso radical y peso de la planta

Se observaron diferencias significativas entre los tratamientos del bioensayo prueba de biocontrol según el peso radical ($F= 2.48, p=0.0001$), peso foliar ($F=2.15, p=0.0001$) y peso de la planta ($F= 2.39, p=0.0001$).

El *Trichoderma* que aumento significativamente los parámetros evaluados en las plantas de banano es TCL1 con un peso de raíz de 9,6 gramos, peso del follaje de 21,5 gramos y peso de la planta con 31 gramos; en comparación al testigo absoluto y los testigos referenciales. El hongo endofítico TCL1 incremento los porcentajes de peso desde 109% hasta 148% con respecto al testigo absoluto. El *Trichoderma* TCL1 tiene un efecto significativo sobre el aislado 2 de *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense*. Otro grupo de *Trichoderma* spp., que aumento significativamente el peso de la raíz, follaje y de las plantas son TC9, TC12, TC8, TS2, TD7, TCL6, TB1 y TJ5 en comparación al resto de los tratamientos. El *Trichoderma* TC9 tuvo efecto sobre los aislamientos 2 y 4 de *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense*, en comparación al grupo anterior que solo tuvo efecto sobre el aislado 2 de *Foc*. Los aislados de hongos endofíticos TCL1 y TC9 obtuvieron los mayores incrementos de peso en este estudio (Cuadro 13).

Cuadro 13. Mejores aislamientos de *Trichoderma* spp., y porcentajes relativos (entre paréntesis) para las variables peso radical (g), peso del follaje (g) y peso de la planta (g) al sacrificar las plantas en la finalización del bioensayo de biocontrol

Trichoderma	Peso radical		Peso del follaje		Peso de la planta	
	FOC2	FOC4	FOC2	FOC4	FOC2	FOC4
TCL1	9,6(148) ^a	7,1(109) ^{bcde}	21,5(117) ^a	17,1(93) ^{abcdef}	31(125) ^a	24,2(98) ^{abcde}
TC9	8,6(132) ^{ab}	8,2(126) ^{abc}	18,5(101) ^{abcdef}	19,8(108) ^{abc}	27,1(109) ^{abc}	28(113) ^{abc}
TC12	8,3(128) ^{abc}	6,4(98) ^{bcde}	19,1(104) ^{abcdef}	16,4(90) ^{abcdef}	27,4(110) ^{abc}	22,8(92) ^{bcde}
TC8	8,1(125) ^{abcde}	6,2(95) ^{cde}	18,5(101) ^{abcdef}	15(82) ^{bcdef}	26,6(107) ^{abcd}	21,2(85) ^{bcde}
TS2	8(123) ^{abcde}	5,1(78) ^e	20,6(113) ^{ab}	12,1(66) ^f	28,6(115) ^{ab}	17,1(69) ^e
TD7	6,6(102) ^{bcde}	7,8(120) ^{abcde}	19,3(105) ^{abcde}	19,4(106) ^{abc}	25,8(104) ^{abcde}	27,3(110) ^{abc}
TCL6	4,9(75) ^e	7,7(118) ^{abcde}	12,9(70) ^f	17,3(95) ^{abcdef}	17,8(72) ^{de}	24,9(100) ^{abcde}
TB1	7,4(114) ^{abcde}	5,1(78) ^{de}	18,3(100) ^{abcdef}	11,7(64) ^f	25,7(104) ^{abcde}	16,9(74) ^e
TJ5	7,3(112) ^{abcde}	6,8(105) ^{bcde}	19,2(105) ^{abcdef}	17,8(97) ^{abcdef}	26,5(107) ^{abcde}	24,5(99) ^{abcde}
TCL4	6,8(105) ^{bcde}	7,2(111) ^{bcde}	14,3(78) ^{cdef}	16,5(90) ^{abcdef}	21(85) ^{bcde}	23,6(95) ^{abcde}
TC2	7,1(109) ^{bcde}	5,7(88) ^{de}	17,4(95) ^{abcdef}	13,9(76) ^{def}	24,5(99) ^{abcde}	19,6(79) ^{de}
TD6	7,1(109) ^{bcde}	5,7(88) ^{de}	18,3(100) ^{abcdef}	15(82) ^{bcdef}	25,3(102) ^{abcde}	20,7(83) ^{cde}
TM1	5,9(91) ^{cde}	7,1(109) ^{bcde}	17,5(96) ^{abcdef}	18,1(99) ^{abcdef}	23,4(94) ^{abcde}	25,1(101) ^{abcde}
TD3	6,7(103) ^{bcde}	7(108) ^{bcde}	18,1(99) ^{abcdef}	17,2(94) ^{abcdef}	24,8(100) ^{abcde}	24,1(97) ^{abcde}
TC6	7(108) ^{bcde}	5(77) ^e	19(104) ^{abcdef}	13,7(75) ^{ef}	26(105) ^{abcde}	18,6(75) ^{de}
TP3	6(92) ^{cde}	6,8(105) ^{bcde}	13,6(74) ^f	19,4(106) ^{abcd}	19,6(79) ^{de}	26,3(106) ^{abcde}
T. refer.	6,7(103) ^{bcde}	6,3(97) ^{bcde}	13,7(75) ^{ef}	14,8(81) ^{bcdef}	20,4(82) ^{cde}	21,4(86) ^{bcde}
T. abs.	6,5(100) ^{bcde}		18,3(100) ^{abcdef}		24,8(100) ^{abcde}	
TV3	6,3(97) ^{bcde}	5,7(88) ^{de}	14,7(80) ^{bcdef}	16,1(88) ^{abcdef}	20,9(84) ^{bcde}	21,9(88) ^{bcde}
TCL2	6(92) ^{cde}	5,9(91) ^{cde}	13,9(76) ^{def}	14,7(80) ^{bcdef}	19,8(80) ^{cde}	20,6(83) ^{cde}
TE5	5,8(89) ^{cde}	5,1(78) ^e	15,2(83) ^{abcdef}	13(71) ^f	21(85) ^{bcde}	18(73) ^{de}
TV4	5,1(78) ^{de}	5,4(83) ^{de}	16,1(88) ^{abcdef}	14,9(81) ^{bcdef}	21,2(85) ^{bcde}	20,3(82) ^{cde}

Letras distintas indican diferencias significativas ($p \leq 0.05$).

4.2.5 Correlación de las variables del bioensayo de biocontrol y de antibiosis

Se detectó correlación entre las variables amarillamiento y porcentaje de incidencia ($p=0,03$ $r=0,034$), entre la marchitez y el porcentaje de incidencia ($p=0,03$ $r=0,33$), entre marchitez y amarillamiento ($p=0,001$ $r=0,99$), entre las variables decoloración del corno y amarillamiento ($p=0,001$ $r=0,49$) entre la decoloración del corno y la marchitez ($p=0,001$

$r=0,46$) entre las variables altura de la planta y la marchitez ($p=0,03$ $r=-0,34$), entre la altura de la planta y el amarillamiento ($p=0,03$ $r=-0,34$). Así mismo se detectó correlaciones entre la variable peso radical de la planta y el amarillamiento ($p=0,001$ $r=-0,54$), la marchitez ($p=0,001$ $r=-0,55$) y la decoloración del cormo ($p=0,001$ $r=-0,49$). Para el peso del follaje se detectó correlación entre el amarillamiento ($p=0,001$ $r=-0,69$), la marchitez ($p=0,001$ $r=-0,70$) y la decoloración del cormo ($p=0,01$ $r=-0,4$). Para el peso de la planta se detectó correlación en las variables amarillamiento ($p=0,001$ $r=-0,67$), marchitez ($p=0,001$ $r=-0,68$) y decoloración del cormo ($p=0,01$ $r=-0,44$) (Cuadro 14).

No obstante, no se detectó correlación para la variable reducción del crecimiento de los aislados de *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* en la prueba de cocultivo en comparación a las demás variables de la prueba de biocontrol en el presente estudio.

Cuadro 14. Comportamiento de los 20 mejores aislamientos endofíticos de *Trichoderma* spp., en las pruebas de cocultivo y biocontrol por medio de una prueba de coeficiente de correlación de Spearman

Variables	C. r. FOC	% Incidenc.	Amarill.	Marchit.	D. cormo	Altura	No. hoja	D. pseud.	Anch. ter. h.	P. radical	P. follaje	P. planta
C. r. FOC	1,00	0,98	0,83	0,75	0,7	0,11	0,35	0,11	0,46	0,48	0,43	0,41
% Incidenc.	0,00	1,00	0,03	0,03	0,96	0,79	0,3	0,66	0,75	0,55	0,92	0,73
Amarill.	-0,03	0,34	1,00	0,00	0,00	0,03	0,14	0,06	0,71	0,00	0,00	0,00
Marchit.	-0,05	0,33	1,00	1,00	0,00	0,03	0,15	0,05	0,83	0,00	0,00	0,00
D. cormo	-0,06	-0,01	0,49	0,46	1,00	0,32	0,75	0,73	0,69	0,00	0,01	0,01
Altura	-0,25	0,04	-0,34	-0,34	-0,16	1,00	0,35	0,45	0,39	0,75	0,13	0,17
No. hoja	0,15	-0,16	-0,23	-0,22	0,05	0,14	1,00	0,24	0,92	0,45	0,92	0,99
D. pseud.	-0,25	-0,07	-0,29	-0,3	0,06	0,12	0,18	1,00	0,75	0,05	0,02	0,01
Anch. ter. h.	0,12	0,05	-0,06	-0,03	0,06	0,13	0,02	0,05	1,00	0,29	0,8	0,69
P. radical	0,11	0,09	-0,54	-0,55	-0,49	0,05	-0,12	0,31	-0,16	1,00	0,00	0,00
P. follaje	0,12	0,02	-0,69	-0,7	-0,4	0,24	0,02	0,35	-0,04	0,81	1,00	0,00
P. planta	0,13	0,05	-0,67	-0,68	-0,44	0,21	0	0,38	-0,06	0,89	0,98	1,00

4.2.6 Agrupación de los aislamientos endofíticos de *Trichoderma* spp., por medios de las variables repuestas en la prueba de biocontrol

Por medio de un dendograma se identificó el índice de distancia de Euclidea y el método de Ward, donde fueron separados 6 grupos de aislamientos endofíticos de *Trichoderma* spp., (Figura 12) por medio de las variables respuestas evaluadas en la prueba de biocontrol (Cuadro 15).

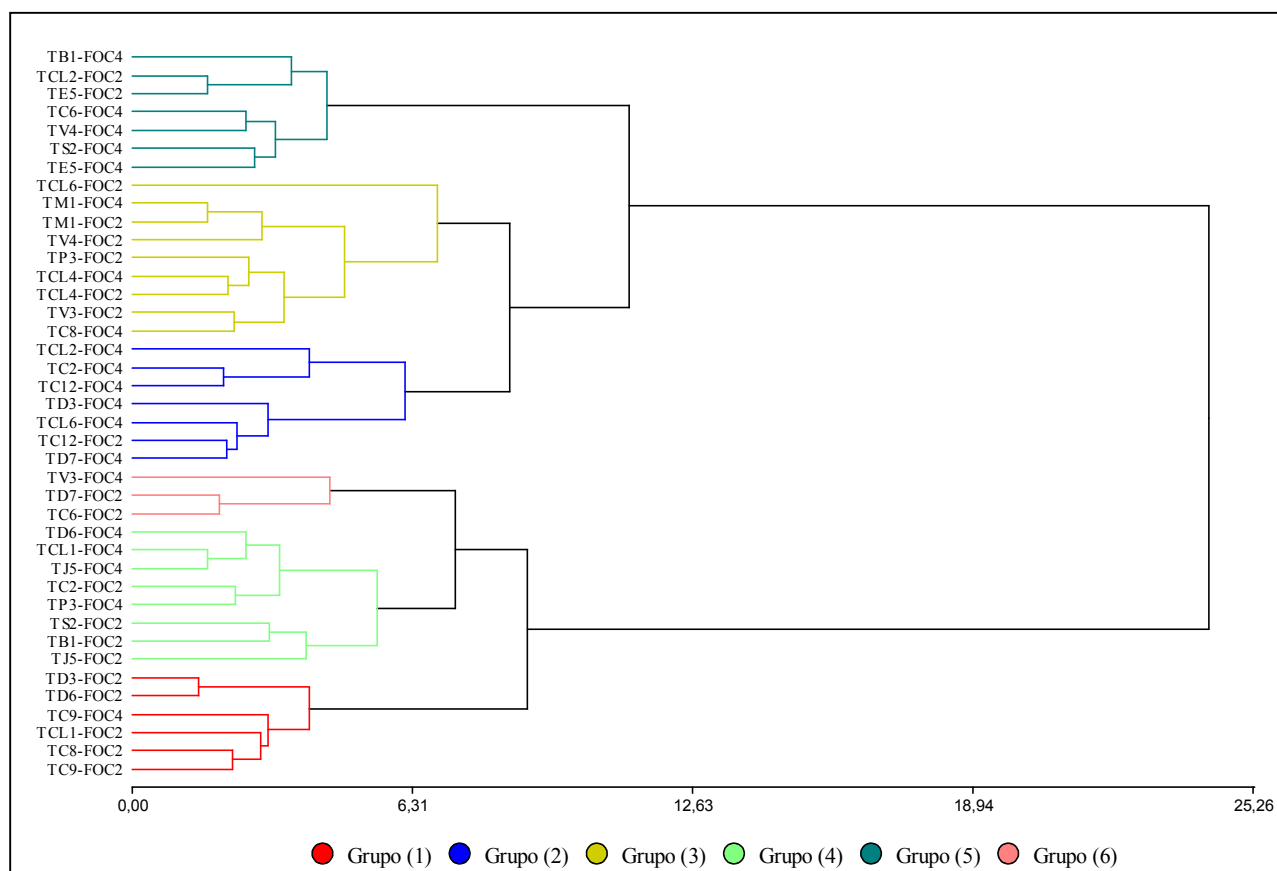


Figura 12. Dendrograma de grupos de aislamientos endofíticos de *Trichoderma* spp.

Por medio de esta agrupación, se identificaron 3 grupos importantes. Por que obtuvieron los promedios más altos para la reducción de la incidencia, amarillamiento, marchitez y decoloración del corno, pero estos promedios variaron para cada uno de los grupos, por haber presentado distintos comportamientos en el bioensayo de biocontrol. Además, estos grupos promovieron parámetros de crecimientos en las vitroplantas del cultivar Gros Michel (AAA) en condiciones de invernadero (Figura 12). El grupo 1 está conformado por los aislamientos endofíticos de *Trichoderma* spp., TC9, TC8, TCL1, TD6 y TD3. El TC9 fue efectivo en los aislados de FOC2 y FOC4. El grupo 4 fueron los aislamientos de *Trichoderma* spp., TJ5, TB1, TS2, TP3, TC2, TCL1 y TD6; en este grupo TJ5 mostró efecto en los aislados FOC2 y FOC4, y el grupo 6 compuesto por TC6, TD7 y TV3, que no mostraron un efecto particular sobre los dos aislamientos de *Foc* (Figura 12).

Se procedió a clasificar los grupos de aislamientos endofíticos de *Trichoderma* spp., por medio de una tabla, donde se obtuvieron los números de individuos y los promedios de las variables de síntomas externos e internos, parámetros de crecimiento y de peso que componen

a cada grupo (Cuadro 15). La variable altura no presentó diferencias significativas en los grupos de este bioensayo, contrario a las variables de incidencia, amarillamiento, marchitez, decoloración del corno, parámetros de crecimiento y de peso que sí mostraron diferencias significativas (Cuadro 15). El grupo 1, presentó 6 individuos con los promedios de reducción del amarillamiento más alto con 0,73 y decoloración del corno con 0,85; así mismo con los promedios más altos para el peso radical y el peso del follaje con 0,67 y 0,76; pero no así en incidencia, marchitez, número de hojas, diámetro del pseudotallo y ancho de la tercera hoja con los promedios más bajos (Cuadro 15). Sin embargo el grupo cuatro presentó ocho individuos, obteniendo los mayores promedios para la reducción de la incidencia con 0,36 y amarillamiento con 0,68; para número de hojas obtuvo un promedio de 0,68 y diámetro del pseudotallo de 0,47, pero este grupo no es muy bueno para la reducción de marchitez y decoloración del corno, además, presentó los promedios más bajos en ancho de la tercera hoja, peso radical y peso del follaje (Cuadro 15). En el grupo seis fueron tres individuos que obtuvieron altos promedios en la reducción de la incidencia con 0,29 y amarillamiento con 0,61 y los promedios más altos en el número de hojas con 0,72, diámetro del pseudotallo con 0,6 y ancho de la tercera hoja con 0,67 a diferencias de los grupos uno y cuatro. Pero sus promedios fueron bajos en la reducción de la marchitez y decoloración del corno con 0,4 y 0,38.

Cuadro 15. Clasificación de los grupos de aislamientos endofíticos de *Trichoderma* spp., obteniéndose el número de individuos y el promedio para cada grupo en sus variables

Grupo	Incidencia	Amarillamiento	Marchitez	D. corno	Altura	No. hoj.	D. pseud.	Anch. ter. h.	P. radical	P. follaje	n
1	0,08 ^a	0,73 ^c	0,28 ^a	0,85 ^c	0,47 ^a	0,62 ^b	0,53 ^b	0,12 ^a	0,67 ^c	0,76 ^d	6
2	0,04 ^a	0,42 ^b	0,58 ^b	0,58 ^b	0,39 ^a	0,22 ^a	0,25 ^a	0,28 ^b	0,44 ^b	0,53 ^{bc}	7
3	0,13 ^a	0,44 ^b	0,56 ^b	0,41 ^{ab}	0,46 ^a	0,7 ^b	0,41 ^{ab}	0,15 ^a	0,27 ^a	0,38 ^b	8
4	0,36 ^b	0,68 ^c	0,33 ^a	0,59 ^b	0,43 ^a	0,68 ^b	0,47 ^b	0,15 ^a	0,46 ^b	0,65 ^{cd}	8
5	0,14 ^a	0,15 ^a	0,86 ^c	0,23 ^a	0,31 ^a	0,62 ^b	0,35 ^{ab}	0,16 ^{ab}	0,09 ^a	0,18 ^a	7
6	0,29 ^b	0,61 ^c	0,4 ^a	0,38 ^{ab}	0,46 ^a	0,72 ^b	0,6 ^b	0,67 ^c	0,33 ^{ab}	0,66 ^{cd}	3

Letras distintas indican diferencias significativas ($p \leq 0.05$).

5 DISCUSIÓN

5.1 Bioensayo 1. Prueba de antibiosis sobre los tres aislamientos de *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense*

Los aislamientos endofíticos de *Trichoderma* spp., mostraron la reducción del crecimiento radial del patógeno *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense*, para los aislados FOC2 y FOC4 en condiciones *in vitro*, seleccionando 20 hongos endofíticos. Los aislados que obtuvieron la mayor inhibición de crecimiento fueron TB1 con 53, 46% en el aislado FOC4 y TV3 con 38,82% para el aislado FOC2. Su diferencia en el porcentaje de reducción es clara, ya que el crecimiento radial de FOC4 es mucho mayor con respecto a FOC2. Por lo tanto el efecto de reducción de FOC4 es mayor al confrontarse con los aislados endofíticos de *Trichoderma* spp., este cocultivo entre los dos organismos desencadena varios procesos, siendo el crecimiento del micelio de *Trichoderma* rápido, para competir por espacio y fuentes de nutrientes que están presentes en el plato Petri de PDA al 100% acidificado, generando un efecto indirecto en la reducción del crecimiento radial de los aislamientos de FOC2 y FOC4 al ocupar su espacio y suministro de nutrientes (Howell 2003; Woo *et al.*, 2006; Vinale *et al.*, 2008). Al momento del cocultivo, la actividad micoparasítica de *Trichoderma*, provoca una desintegración de las paredes celulares del patógeno y muerte del mismo (Howell 2003; Woo *et al.*, 2006; Vinale *et al.*, 2008). Este efecto directo sobre las estructuras de sobrevivencia y reproducción del patógeno provoca posiblemente su inhibición de crecimiento en condiciones *in vitro*. Con base a estos posibles argumentos, el mecanismo de antibiosis no se generó en esta prueba realizada en este estudio, por que se seleccionaron 20 aislados de hongos endofíticos que no tuvieron consistencia en la prueba de biocontrol.

Estudios realizados con los aislamientos del patógeno *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense*, FOC2 y FOC4, por Lara (2009) utilizando bacterias endofíticas reportó un 65% de reducción del crecimiento radial de estos aislados, para una prueba de antibiosis, mecanismo que no se presentó durante la prueba de biocontrol. Así mismo Noreskal (2010) encontró la inhibición del crecimiento radial del patógeno *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* raza 1, por los aislamientos de hongos y bacterias endofíticas en condiciones *in vitro*, que posteriormente fueron evaluadas en prueba de biocontrol, obteniendo un comportamiento diferente.

Varios autores encontraron la reducción del crecimiento radial de *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense*, en condiciones *in vitro*, pero al momento que fueron seleccionados para la

prueba de biocontrol estos se comportaron diferentes, por lo que se expresan varios mecanismos y la antibiosis es un mecanismo que no está presente en esta selección (Mitov y Oliva 1975; Raguchander *et al.*, 1997; Saravanan *et al.*, 2003; Thangavelu *et al.*, 2003; Zhang *et al.*, 2004, Thangavelu *et al.*, 2004; Nel *et al.*, 2006).

De acuerdo a lo anterior, en este estudio se presentaron distintos mecanismos de acción en la actividad antagonista de los aislamientos endofíticos de *Trichoderma* spp.

5.2 Bioensayo 2. Prueba de biocontrol sobre los dos aislamientos de *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense*

No se presentó correlación para la prueba antibiosis con respecto a la prueba de biocontrol, debido a que la selección de los 20 aislamientos endofíticos de *Trichoderma* spp., que redujeron el crecimiento radial del patógeno *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense*, para los aislamientos de FOC2 y FOC4; no presentaron este efecto al momento que se evaluaron en la segunda etapa las mediciones de incidencia, síntomas externos e internos, parámetros de crecimientos y peso en las vitroplantas de banano del cultivar Gros Michel (AAA). Demostrando un comportamiento totalmente distinto sobre los aislamientos de FOC2 y FOC4 al momento que se integran los factores suelo, planta, humedad y temperatura en las condiciones de invernadero.

Para las evaluaciones de incidencia donde sobresale el aislamiento endofítico de *Trichoderma* spp., TJ5 que demostró un efecto en el porcentaje de reducción de la enfermedad Mal de Panamá. Este efecto de reducción en la incidencia fue de 37,5% para el aislado FOC2 y para el aislado FOC4 fue de 62,5% al final de la octava medición. Por lo que el aislado FOC4 fue más patogénico con respecto al aislado FOC2, para la incidencia. Este aislado endofítico de *Trichoderma* spp., TJ5 retrasó la aparición de los síntomas externos en más de tres semanas, aumentando el período de incubación de la enfermedad en condiciones de invernadero. Este efecto en retardar el período de incubación de la enfermedad, posiblemente se deba a la colonización y establecimiento temprano en el sustrato esterilizado, en el sistema radical, tejidos internos del cormo y los tejidos vasculares de la planta por el aislado endofítico de *Trichoderma* spp., TJ5, mostrando una mayor competencia para ocupar estos espacios, que son colonizados por la mayoría de los patógenos oportunistas o fitopatógenos. Además, el aislado de *Trichoderma* spp., es proveniente de la finca Las Juntas supresora de fitonematodos que son patógenos del suelo que están en interacción con hongos patogénicos como el caso del

Mal de Panamá. Resultados obtenidos por Lara (2009) demostraron que los aislamientos endofíticos de la bacteria F7B13 presentó una reducción de la incidencia entre el 60% y 76% de la enfermedad al final de la octava evaluación, para los aislamientos de *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense*, FOC2, FOC4 y FOC8. Estos resultados son sumamente representativos e importantes ya que en este estudio se evaluaron los aislamientos FOC2 y FOC4 en las vitroplantas de banano del cultivar Gros Michel (AAA). Otros autores refuerzan la acción de los aislamientos de *Trichoderma* spp., para la reducción de la incidencia de la enfermedad Mal de Panamá como Thangavelu *et al.*, (2003) donde reporta que *T. harzianum* Th-10 registró una alta reducción en la incidencia de la enfermedad con 48% a nivel de invernadero y 51% en condiciones de campo para el combate de *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* raza 1. Así mismo Mitov y Oliva (1975) documentaron que las evaluaciones de incidencia y síntomas externos (amarillamiento y marchitez) de la enfermedad Mal de Panamá, están ausentes hasta el último día en las plantas de banano del cultivar Gros Michel (AAA) inoculadas 7 días antes con los tres linajes de *T. Lignorum*. También Pérez *et al.*, (2003) y Pérez *et al.*, (2009) reportaron la eficacia *Trichoderma harzianum* A34 en la reducción de la incidencia y síntomas externos de la enfermedad Mal de Panamá en plantas de Burro CEMSA Bluggoe -ABB, FHIA 03 -AABB y FHIA 23 -AAAB, además de mantener su producción por más de cinco años en suelos conducibles a la enfermedad.

En la variable síntomas externos expresados en amarillamiento y severidad de la enfermedad Mal de Panamá en las vitroplantas de banano del cultivar Gros Michel (AAA), los síntomas fueron reducidos por las inoculaciones tempranas de los aislamientos endofíticos de *Trichoderma* spp., donde TC9 presentó una reducción eficiente para amarillamiento y marchitez con 92% para el aislado FOC2, y para el aislado FOC4 el efecto de reducción fue menor con 85% para amarillamiento y 86% para marchitez, mostrando una mayor agresividad de la enfermedad provocada por este aislado de *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense*, con respecto al aislado FOC2. Pero el aislado endofítico de *Trichoderma* spp., TP3 mostró una reducción mayor del amarillento y marchitez del 90% y 91% para el aislado FOC4, en comparación al aislado FOC2 que obtuvo menor reducción en amarillamiento y marchitez con 68% y 69% respectivamente. Estos datos demostraron que los aislados endofíticos de *Trichoderma* spp., difieren en su capacidad de reducción de los síntomas externos con respecto a cada aislado de FOC2 y FOC4. Además, el aislado endofítico de *Trichoderma* spp., TCL1 redujo el amarillamiento y marchitez a un 90% para el aislando FOC2, en comparación

al aislado FOC4 con una reducción del 82% para amarillamiento y 83% para marchitez. Con respecto a la variable síntomas internos provocados por la enfermedad Mal de Panamá en las vitroplantas de banano del cultivar Gros Michel (AAA), el aislado endofítico de *Trichoderma* spp., TC9 redujo la decoloración del cormo a un 74%, seguido por los aislados TD3, TD6, TC12, TCL1, TC8, TJ5, TC2, TCL4, TP3, TD7, TC6 y TS2 que redujeron la decoloración del cormo de 69% a 53% con respecto a los otros tratamientos. Estos datos reflejaron una activación de los mecanismos de defensas de las plantas al ser inoculadas por estos aislamientos endofíticos de *Trichoderma* spp., a nivel de los tejidos internos, incrementando su resistencia a las enfermedades (Howell y Hason 2004; Vinale *et al.*, 2008), principalmente su efecto de reducción en las estructuras reproductivas como microconidias, macroconidias y clamidosporas que son las causantes de las infecciones y los síntomas externos e internos en las plantas de banano del cultivar Gros Michel (AAA). Esta reducción se deba a la activación de paredes y principalmente de la membrana celular que detienen el paso del patógeno y su tasa de crecimiento, así como evitar la colonización y el establecimiento de los espacios intercelulares, que son ocupados tempranamente por los hongos endofíticos de *Trichoderma* spp., además, de activar la producción de enzimas líticas y metabolitos tóxicos favoreciendo el biocontrol (Harman *et al.*, 2004; Vinale *et al.*, 2008).

Con respecto a los menores niveles amarillamiento y marchitez para biocontrol Lara (2009) encontró que bacterias endofíticas presentaron menores niveles de amarillamiento y marchitez siendo F7B5 con 2,13 en comparación a F7B10 con 4,23 para los aislados FOC2, FOC4 y FOC8. Así mismo Noreksal (2010) demostró que hongos endofíticos presentaron menores índices de síntomas externos de la enfermedad, donde el aislamiento No.39 fue el que obtuvo menor índice con 1,6 en comparación con el testigo *Foc* con 2,6. Saravanan *et al.*, (2003) y Raguchander *et al.*, (1997) documentaron los menores índice de porcentajes de marchitez en plantas de banano del cultivar Rasthali susceptibles a la raza 1 de *Foc* durante 11 meses con 22, 23% y 18,06% al inocularlas previamente con tratamientos de *P. fluorescentes*, *T. viride*, *T. harzianum* y aplicaciones de torta de neem en comparación al control con 55,61%.

El aislamiento endofítico de *Trichoderma* spp., TC9 mostró un efecto sobre los aislamientos de *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense*, FOC2 y FOC4, al final de las evaluaciones realizadas en el bioensayo biocontrol en el presente estudio. Logrando una reducción de los síntomas externos e internos en las vitroplantas de banano del cultivar Gros Michel (AAA). Este aislado endofítico TC9 es proveniente de la finca Cartagena, siendo una

finca supresora a fitonematodos que también atacan el sistema radical al igual que el hongo causante del Mal de Panamá; la mayoría de los aislados endofíticos de *Trichoderma* spp., que mostraron los menores índices de enfermedad y las mayores reducciones, son provenientes de esta finca, posiblemente este aislado TC9 presentó mecanismo de biocontrol mas duraderos y eficientes a los aislados FOC2 y FOC4 con respecto al resto de los aislados endofíticos de *Trichoderma* spp.

Esto ha permitido que los aislamientos endofíticos de *Trichoderma* spp., funcionen como agentes de biocontrol para el manejo de las enfermedades transmitidas por fitopatógenos del suelo, incrementando la resistencia sistémica en las plantas de banano (Pocasangre 2000; Pocasangre *et al.*, 2000; Thangavelu *et al.*, 2003; Chet *et al.*, 2004; Forsyth *et al.*, 2006; Nel *et al.*, 2006; Mausan *et al.*, 2007; Vinale *et al.*, 2008; Mendoza y Sikora 2009; Hoyos-Carvajal *et al.*, 2009).

5.3 Promoción de crecimiento de los aislados endofíticos de *Trichoderma* spp.

En la presente investigación el aislamiento endofítico de *Trichoderma* spp., TCL1 incrementó desde un 109% hasta 148% el peso de la planta, peso del follaje y peso de la raíz. TCL1 aumentó los parámetros de peso con la interacción FOC2, en comparación a la interacción con FOC4 donde estos parámetros decrecieron. Este comportamiento fue debido a que el aislado FOC4 es más agresivo, disminuyendo el peso de las plantas. Así mismo aislamientos endofíticos de *Trichoderma* spp., TC9, TC12, TC8, TS2, TD7, TCL6, TB1 y TJ5 presentaron los mejores pesos de raíz, follaje y de la planta con respecto a los aislados FOC2 y FOC4 bajo condiciones de invernadero. Esto es favorecido por la colonización y el establecimiento de los *Trichoderma* spp., en las raíces, promoviendo el crecimiento radical, del follaje y la disponibilidad de nutrientes como nitrógeno, fosforo, potasio, manganesio y hierro, vital para aumentar la resistencias a las enfermedades y mejorar la producción (Harman *et al.*, 2004; Vinale *et al.*, 2008). Los aislamientos endofíticos de *Trichoderma* spp., que aumentaron el crecimiento de las plantas en las variables altura, número de hojas, diámetro del pseudotallo y el ancho de la tercera hoja son TCL6, TV3, TD7, TD6, TS2 y TC8 con respecto a las distintas interacciones de los aislados de FOC2 y FOC4. Estos resultados concuerdan con los encontrados por Lara (2009) donde documentó que bacterias endofíticas F3P2, F1B9, F2PA15, F7B13 y F1B5 incrementaron los parámetros de número de hojas, diámetro del

pseudotallo, largo de la tercera hoja, peso de la planta, peso del follaje y peso de la raíz. Resultados similares fueron encontrados por Noreksal (2009) y Ting *et al.*, (2008), quienes realizaron inoculaciones con aislamientos de hongos y bacterias endofíticas que promovieron los parámetros de crecimiento en plantas de banano.

En este estudio se encontraron 3 grupos de aislamientos endofíticos de *Trichoderma* spp., que presentaron diferencias significativas en los promedios de las variables de incidencia, amarillamiento, marchitez, decoloración del cormo y los parámetros de crecimiento y de peso. Pero estos grupos se comportaron de forma diferente en la reducción de los síntomas externos e internos y para la promoción de los parámetros de crecimiento. Mostrando falta de correlación, ya que un grupo reduce la incidencia y amarillamiento, pero no marchitez y decoloración del cormo. Esto también sucede con las variables de crecimiento, unos mostraron efecto en el peso de la raíz y del follaje, pero no en las variables de crecimiento.

El grupo uno mostró los promedios más altos en la reducción del amarillamiento y decoloración del cormo con 0,73 y 0,85. Sin embargo el grupo cuatro y seis obtuvieron los promedios más alto en la reducción de la incidencia con 0,36 y 0,29; pero en la reducción del amarillamiento mostraron un promedio de reducción inferior al grupo uno con 0,68 y 0,61. No obstante el grupo cinco fue representativo en la reducción de la marchitez con el promedio más alto de 0,86 superando a los grupos uno, cuatro y seis.

El grupo uno mostró los promedios más alto en las variables peso de la raíz y peso del follaje con 0,67 y 0,76; seguidos por los grupos seis y cuatro que mostraron promedios inferiores en el peso del follaje con 0,66 y 0,65. Sin embargo el grupo seis mostró los promedios más altos en las variables número de hojas con 0,72, diámetro del pseudotallo con 0,60 y ancho de la tercera hoja con 0,67; posteriormente los grupos cuatro y uno mostraron los promedios inferiores en el número de hojas con 0,68 y 0,62; además de los promedios más bajos en el diámetro del pseudotallo en el grupo cuatro con 0,47 y el grupo uno con 0,53.

De acuerdo a este comportamiento los grupos de aislamientos endofíticos de *Trichoderma* spp., son capaces de promover el desarrollo vegetativo de las plantas del cultivar Gros Michel (AAA) en condiciones de invernadero (Vinale *et al.*, 2008).

6 CONCLUSIONES

6.1 Prueba de antibiosis

- Veinte de cincuenta aislamientos endofíticos de *Trichoderma* spp., redujeron significativamente el crecimiento radial de los aislamientos de *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* en comparación con los testigos FOC2 y FOC4.
- Los hongos endofíticos TV3 y TB1 inhibieron desde un 38,82 a 53,46% de crecimiento radial de *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* en comparación con los testigos FOC2 y FOC4.
- Los hongos endofíticos TB1, TC12, TC2, TC6, TC8, TC9, TCL1, TCL2, TCL4, TCL6, TD3, TD6, TD7, TE5, TJ5, TM1, TP3, TS2, TV3 y TV4 presentaron el mayor efecto de inhibición y fueron seleccionadas para la prueba de biocontrol.

6.2 Prueba de biocontrol

- Entre los aislamientos endofíticos de *Trichoderma* spp., seleccionados en prueba de antibiosis y prueba de biocontrol, no existió consistencia, por lo tanto la antibiosis como mecanismo de acción se descarta.
- El hongo endofítico TJ5 retardó la aparición de los síntomas externos en más de tres semanas en comparación con los otros tratamientos, presentando 37,5% de incidencia.
- Los hongos endofíticos TC9, TP3 y TCL1 redujeron desde un 92% hasta 90% los síntomas externos de la enfermedad en comparación de los testigos referenciales.
- Los aislados endofíticos de *Trichoderma* spp., TC9, TC8, TCL1, TD6 y TD3 del grupo uno presentaron los promedios más altos en reducción de amarillamiento y decoloración del corno con 0,73 y 0,85. Sobresaliendo el aislado TC9 que presentó un efecto sobre los aislados FOC2 y FOC4.
- Los hongos endofíticos TC9, TD3, TD6, TC12, TCL1, TC8 y TJ5 redujeron la enfermedad desde un 74% hasta 63% la decoloración del corno en comparación a los demás tratamientos.

6.3 Promoción de crecimiento

- El hongo endofítico de *Trichoderma* spp., TCL1 incrementó el peso de la raíz y el peso del follaje y de la planta en un 109% y 148% respectivamente en comparación al testigo absoluto.
- El hongo endofítico TCL6 incrementó la altura de las plantas; TV3, TD7 y TD6 aumentaron el número de hojas y TCL4 presentó un aumento en el ancho de la tercera hoja.
- Los aislados endofíticos de *Trichoderma* spp., TC9, TC8, TCL1 y TD6, así como el grupo uno presentaron los promedios más altos en el peso de la raíz con 0,67 y peso del follaje con 0,76.

7 RECOMENDACIONES

- Repetir la prueba de biocontrol con el nuevo grupo élite de hongos endofíticos TC9, TC8, TCL1, TD6 y TD3 que se ha generado de esta nueva investigación, para confirmar la consistencia a la acción antagonista de los hongos endofíticos en el biocontrol de *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense*.
- Realizar evaluaciones para la promoción de crecimiento vegetativo de los hongos endofíticos élite TC9, TC8, TCL1, TD6 y TD3 en ausencia del patógeno.
- Realizar estudios de campo con los hongos endofíticos élite TC9, TCL1 y TJ5 en suelos bananeros donde está la enfermedad.
- Realizar análisis moleculares a los hongos endofíticos de *Trichoderma* spp., élite TC9 y TC8 procedentes de la finca Cartagena, para su identificación y estudios posteriores como agentes de biocontrol.

8 BIBLIOGRAFÍA

- Aguilar, EA; Turner, DW; Sivasithamparam, k. 2000. Mecanismos propuestos acerca de la predisposición de los bananos Cavendish al marchitamiento por *Fusarium* durante la hipoxia. *InfoMusa* 9(2):9-12.
- Alabouvette, C; Lemanceau, P; Steinberg, C. 1993. Recent advances in the biological control of *Fusarium* wilts. *Pesticides Science* 37(4):365-373.
- Ashby, SF. 1913. Banana disease in Jamaica. (Abstract) *Science* 31:754-755.
- Baker, KF; Cook, RJ. 1982. Biological control of plant pathogens. APS. American Phytopathology Soc. St. Paul, MN, USA. 433 p.
- Beed, F; Markham, R. 2008. Strategy elements to transform the banana sector in Africa. An output of the international conference: banana 2008. Mombasa, Kenya, 5-9 october. 16p.
- Bandara, WMMS; Seneviratne, G; Kulasooriya, SA. 2006. International among endophytic bacteria and fungi: effect and potentials. *J. Biosci* 31:645-650.
- Bancroft, J. 1876. Report of the board appointed to inquire into the cause of disease affecting livestock and plants. Queensland 1876. *In* Votes and Proceedings (3):1011-1038.
- Beckman, CH; Halmons, S. 1962. Relation of vascular occluding reactions in banana roots to pathogenicity of root-invading fungi. *Phytopathology* 52:893-897.
- Beckman, CH; Halmons, S; Mace, ME. 1962. The interaction of host, pathogen, and soil temperature in relation to susceptibility to *Fusarium* wilt of banana. *Phytopathology* 52:135-140.
- Beckman, CH; Talboys, PW. 1990. Host responses to the pathogen. *In* Ploetz, RC. ed. *Fusarium Wilt of Banana*. APS Press, Amer. Phytopathol. Soc., St. Paul, MN USA, 93-105 pp.
- Belimov, AA; Safronova, VI; Sergeyera, TA; Egoro, TN; Matveyeva, VA; Tsyganov, VE; Borisov, AY; Tikhonovich, IA; Kluge, C; Preisfeld, A; Dietz, KJ; Stepanok, VV. 2001. Characterization of plant growth promoting rhizobacteria isolated from polluted soil

- and containing 1-aminocyclopropane-1-carboxylate deaminase. *Canadian Journal Microbiology* 47:642-652.
- Benitez, T; Rincón, AM; Limón, MC; Codón, AC. 2004. Biocontrol mechanisms of *Trichoderma* strains. *International Microbiology* 7(4):249-260.
- Bentley, S; Pegg, KG; Moore, NY; Davis, RD; Buddenhagen, IW. 1998. Genetic variation among vegetative compatibility groups of *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* analyzed by DNA fingerprinting. *Phytopathology* 88:1283-1293.
- Brandes, EW. 1919. Banana wilt. *Phytopathology* 9:339-389.
- Buddenhagen, IW. 1990. Banana breeding and Fusarium wilt. In Ploetz, R. ed. *Fusarium wilt of banana*. APS Press, Amer. Phytopathology. Soc., St. Paul. MN USA. 107-113 p.
- Burgess, LW; Summerell, BA; Bullock, S, Gott, KP; Backhouse, D. 1994. *Laboratory Manual for Fusarium Research*. 3 ed. Sydney, University of Sydney. 133 p.
- Borges, AJ da S; Trindade, AV; Matos, AP de. 2007. Reduction of fusarium wilt of “banana-maca” by inoculation of arbuscular mycorrhizal fungi. *Pesq. Agropec. bras.*, Brasília 42(1):35-41.
- Cañizares, C. 2003. Estudio sobre poblaciones de hongos endofíticos provenientes de suelos supresivos al nematodo barrenador *Radopholus similis* (Cobb) Thorne en plantaciones comerciales de plátano en la zona de Talamanca, Costa Rica. Tesis Mag. Sc. Turrialba, CR, CATIE. 75 p.
- Cárdenas, JE. 2001. Selección de vitroplantas provenientes de microsecciones de banano de la variedad Gros Michel (AAA) resistentes a la raza 1 del Mal de Panamá (*Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense*). Tesis Mag. Sc. Turrialba, CR, CATIE. 122 p.
- Carroll, G. 1988. Fungal endophytes in stems and leaves: from latent pathogen to mutualistic symbiont. *Ecology* 69(1):2-9.
- Carroll, G; Petrini, O. 1983. Patterns of substrate utilization by some fungal endophytes from coniferous foliage. *Mycologia* 75(1):53-63.
- Champion, J. 1963. Le Bananier. In Maisonneuve et Larose ed. Paris, FR. 263 p.

- Chet, I; Shores, M; Yedidia, I; Viterbo, A. 2004. Mechanisms involved in biocontrol and plant induced resistance by *Trichoderma asparellum* (*T. harzianum* T-203). Journal of Zhejiang University (Agriculture & Life Science) 30(4):385-385.
- Compant, S; Reiter, B; Sessitsch, A; Nowak, J; Clément, C. 2005. Endophytic colonization of *Vitis vinifera* L. by plant growth-promoting bacterium *Burkholderia* sp. Strain Ps JN. Applied and Environmental Microbiology 71(4):1685-1693.
- Daly, A; Walduck, G. 2006. Fusarium Wilt of Banana (Panama Disease) (*Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense*) (en línea). Agnote No 151. Consultado 15 may. 2010. Disponible en http://www.nt.gov.au/d/Content/File/p/Plant_Pest/786.pdf
- Davis, R. 2005. Fusarium wilt (Panama disease) of banana. Plant Protection Service Secretariat of the Pacific Community. Pest Advisory Leaflet no. 42. 4 p.
- Davis, AJ; Say, M; Snow, AJ; Grant, BR. 1994. Sensitivity of *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* to phosphonate. Plant Pathology 43(1):201-205.
- De Ascenso, ARDCF; Dubery, IA. 2000. Panama Disease: cell wall reinforcement in banana roots in response to elicitors from *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* race four. Phytopathology 90:1173-1180.
- Dita, MA; Waalwijk, C; Souza Junior, MT; Kema, GHJ. 2009. Generando conocimientos y herramientas para el control de la raza 4 tropical de *Fusarium oxysporum* f.sp. *cubense*. In REUNIÓN DE GRUPO DE INTERÉS SOBRE LOS RIESGOS DE LA RAZA TROPICAL 4 DE FUSARIUM, BBTV Y OTRAS PLAGAS DE MUSACEAS PARA LA REGIÓN DEL OIRSA, AMERICA LATINA Y EL CARIBE (Documentos de Programa y Resúmenes de la Reunión). 29 al 31 de jul. OIRSA, San Salvador, El Salvador. 21-22 p.
- Di Rienzo, AJ; Macchiavelli, R; Casanoves, F. 2009. Modelos Mixtos en InfoStat. Tutorial, Grupo InFoStat, FCA, Universidad Nacional de Córdoba, AR. 193 p.
- Duijff, BJ; Recorbet, G; Bakker, PAH; Loper, JE; Lemanceau, P. 1999. Microbial antagonism at the root level is involved in the suppression of *Fusarium* wilt by the combination of non-pathogenic *Fusarium oxysporum* Fo47 and *Pseudomonas putida* WCS358. Phytopathology 89:1073-1079.

- FAO (Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación, IT). 2001. Informe sobre producción y demanda de rubros agrícolas (en línea). Consultado 17 nov. 2009. Disponible en http://www.fao.org/index_es.htm
- FAO (Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación, IT). 2004. La economía mundial del banano 1985-2002. Eds. Arias, P; Dankers, C; Lui, P; Pilkauskas. Roma. 104 p.
- FAO (Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación, IT). 2009. Principales enfermedades del banano y plátano: información actualizada sobre su propagación, efectos y estrategias de repuestas. CCP:BA/TF 09/7. 9-11 de diciembre. FAO:Roma.
- Frison, E; Sharrock, S. 1998. The economic, social and nutritional importance of banana in the word. *In* Bananas and food security. International Symposium, INIBAP, Douala, Cameroon 10-14 November, 21-35 p.
- Forsyth, LM; Smith, LJ; Aitken, EAB. 2006. Identification and characterization of non-pathogenic *Fusarium oxysporum* capable of increasing and decreasing Fusarium wilt severity. *Mycological Research* 110(8):929-935.
- Fushs, DR; Moënné-Loccoz, Y; Défago, G. 1997. Non-pathogenic *Fusarium oxysporum* strain Fo47 induces resistance to Fusarium wilt of tomato. *Plant Disease* 81:492-496.
- Gullino, ML. 1992. Control of *Botrytis* rot of grapes and vegetables with *Trichoderma* spp. *In* Tjamos, EC; Papavizas, GC; Cook, RJ. eds. Biological control of plant diseases, progress and challenges for the future. Plenum Press, New York, USA. 125-132 p.
- Harman, GE. 1991. Seed treatment for biological control of plant diseases. *Crop Protection* 10:166-171.
- Harman, GE. 2000. Myths and dogmas of biocontrol: changers in perceptions derived from reseacrhon *Trichoderma harzianum* T-22. *Plant Disease* 84:377-393.
- Harman, GE; Howell, CR; Viterbo, A; Chet, I; Lorito, M. 2004. *Trichoderma* species-opportunistic, avirulent plant symbionts. *Nature Review Microbiology* 2:43-56.
- Harman, GE. 2006. Overview of mechanisms and uses of *Trichoderma* spp. *Phytopathology* 96:190-194.

- Hata, K; Atari, R; Sone, K. 2002. Isolation of endophytic fungi from leaves of *Pasania edulis* and their within-leaf distributions. *Mycoscience* 43:369-373.
- Hason, LE; Howell, CR. 2004. Elicitors of plant defense responses from biocontrol strains of *Trichoderma virens*. *Hytopathology* 94(2):171-176.
- Herbert, JA; Marx, D. 1990. Short-term control of Panama disease of bananas in South Africa. *Phytophylactica* 22(3):339-340.
- Hennessy, C; Walduck, G; Daly, A; Padovan, A. 2005. Weeds hosts *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* tropical race 4 in northern Australia. *Australasian Plant Pathology* 34:115-117.
- Howell, CR. 2003. Mechanisms employed by *Trichoderma* species in the biological control of plant diseases: The history and evolution of current concepts. *Plant Disease* 87(1):4-10.
- Howell, CR; Stipanovic, RD; Lumsden, RD. 1993. Antibiotic production by strains of *Gliocladium virens* and its relation to the biocontrol of cotton seedling diseases. *Biocontrol Science and Technology* 3(4):435-441.
- Howell, CR; Stipanovic, RD. 1983. Gliovirin, a new antibiotic from *Gliocladium virens*, and its role in the biological control of *Pythium ultimum*. *Canadian Journal Microbiology* 29:321-324.
- Hoyos-Carvajal, L; Orduz, S; Bisset, J. 2009. Growth stimulation in bean (*Phaseolus vulgaris* L.) by *Trichoderma*. *Biological Control* 51:409-416.
- Hwang, SC; Ko, WH. 2004. Cavendish banana cultivars resistant to fusarium wilt acquired through somaclonal variation in Taiwan. *Plant disease* 88(6):15-23.
- IITA (Instituto Internacional de Agricultura Tropical). 2008. Banana and Plantain in Africa: Harnessing international partnerships to increase research impact. International conference Mombasa, Kenya, 5-9 de october (en línea). Consultado el 20 de jul. 2010. Disponible en http://www.banana2008.com/cms/details/index_details.aspx.
- Johnston, JR. 1915. La enfermedad del Plátano en Cuba. Estación Experimental Agronómica de Santiago de las Vegas. Circular 47. 9 p.
- Jones, DR. 2000. Disease of banana, Abacá and Enset. CABI Publishing, USA. 547 p.

- Katan, J; Fishler, G; Grinstein, A. 1983. Short and long-term effects of soil solarization and crop sequence on Fusarium wilt and yield of cotton in Israel. *Phytopathology* 73(8):1215-1219.
- Kloepper, JW; Leong, J; Teintze, M; Schroth, M. 1980. *Pseudomonas* Siderophores: a mechanism explaining disease suppressive soil. *Current Microbiology* 4(5):317-320.
- Laksmanan, P; Selvaraj, P; Mohan, S. 1987. Efficacy of different methods for the control of Panama disease. *International Journal of Pest Management* 33(4):373-374.
- Lara, D. 2009. Uso de bacterias endofíticas para el control biológico del Mal de Panamá (*Fusarium oxysporum* f. sp. cubense) en el cultivar Gros Michel (AAA). Tesis Mag. Sc. Turrialba, CR. CATIE. 85 p.
- Larkin , R; Hospkins, D; Martin, F. 1996. Suppression of Fusarium wilt of watermelon by nonpathogenic *Fusarium oxysporum* and other microorganisms recovered from a disease suppressive soil. *Phytopathology* 86(8):812-819.
- Larkin, RP; Fravel, DR. 1999. Mechanisms of action and dose-response relationships governing biological control of Fusarium wilt of tomato by non-pathogenic *Fusarium* spp. *Phytopathology* 89:1151-1161.
- Lemanceau, P; Couteaudier, Y; Alabouvette, C. 1988. Competition for carbon and competition for iron are involved in mechanism of soil suppressiveness to Fusarium wilts. In 5th International Congress of Plant Pathology. Abstrac of Papers. 20-27 agost. Kyoto, JP. 186 p.
- Lemanceau, P; Bakker, PAHM; De Kogel, WJ; Alabouvette,C; Shippers, B. 1993. Effect of pseudobactin 358 produced by *Pseudomonas putida* WSC358 on suppression of *Fusarium* wilt of carnations by non-pathogenic *Fusarium oxysporum*. *Applied and Environmental Microbiology* 58:2978-2980.
- Lemanceau, P; Bakker, PAHM; De Kogel, WJ; Alabouvette,C; Shippers, B. 1994. Antagonistic effect of nonpathogenic *Fusarium oxysporum* Fo47 and *Pseudobactin* 358 upon pathogenic *Fusarium oxysporum* f.sp. *dianthi* . *Applied and Environmental Microbiology* 59:74-82.

- Leslie, JF and Summerell, BA. 2006. The *Fusarium* Laboratory Manual. USA. Blackwell Publishing. 388 p.
- León, J. 2000. Botánica de los cultivos tropicales. 3 ed. IICA. San José, CR. 522 p.
- Lichtemberg, PSF. 2010. Occurrence, incidence and grower perception of *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* in banana intercropped with coffee and trees Costa Rica and Nicaragua smallholders. Thesis Master of Science. INRE, DE. Bonn. 76 p.
- Lorito, M; Woo, SL; Scala, F. 2004. Le biotecnologie utili alla difesa sostenibile delle piante: i funghi. *Agroindustria* 3:181-195.
- Lorito, M; Farkas, B; Rebuffat, S; Bodo, B; Kubicek, C. 1996. Cell wall synthesis is a major target of micoparasitic antagonism by *Trichoderma harzianum*. *Journal of Bacteriology* 178(21):6382-6385.
- Lotan, T; Fluhr, R. 1990. Xylanase, a novel elicitor of pathogenesis-related proteins in Tabacco, uses a now-ethylene pathway for induction. *Plant Physiology* 93:811-817.
- Lugtenberg, B; Leveau, J. 2007. Biocontrol of plants pathogens: principles, promises and pitfalls. In Pinton, R; Varanini, Z; Nannipieri. eds. *The Rhizosphere: Biochemistry and substance at the soil-plant interfase*. 2 ed. CRC Press Taylor & Francis Group. 267-284 p.
- Matsumoto, K.; Barbosa, M.L.; Copati Souza, LA.; Teixeira, JB. 1999. In vitro selection for *Fusarium* wilt resistance in banana. II. Resistance to culture filtrate of race 1 *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense*. *Fruits* 54:97-102.
- Mausam, V; Brar, SK; Tyagi, RD; Surampalli, RY; Valéro, JR. 2007. Antagonistic fungi, *Trichoderma* spp.: Panoply of biological control. *Biochemical Engineering Journal* 37:1-20.
- Mazzola, M. 2002. Mechanisms of natural soil suppressiveness to soilborne diseases. *Antonie van Leeuwenhoek* 81:557-564.
- Mendoza, AR; Sikora, RA. 2009. Biological control of *Radopholus similis* in banana by combined application of the mutualistic endophyte *Fusarium oxysporum* strain 162, the egg pathogen *Paecilomyces lilacinus* strain 251 and the antagonistic bacteria *Bacillus firmus*. *BioControl* 54:263-272.

- Menjivar, RD. 2005. Estudio del potencial antagonista de hongos endofíticos para el biocontrol del nematodo barrenador *Radopholus similis* en plantaciones de banano en Costa Rica. Tesis Mag. Sc. Turrialba, CR, CATIE. 69 p.
- Mitov, N; Oliva, P. 1975. Estudio sobre el Mal de Panamá del Plátano en Cuba. Revista de Agricultura 8(2):12-29.
- Molina, A. 2009. Estado de la incidencia en Asia del marchitamiento por raza tropical 4 de *Fusarium* en el cultivo de banano. In REUNIÓN DE GRUPO DE INTERÉS SOBRE LOS RIESGOS DE LA RAZA TROPICAL 4 DE FUSARIUM, BBTV Y OTRAS PLAGAS DE MUSACEAS PARA LA REGIÓN DEL OIRSA, AMERICA LATINA Y EL CARIBE (Documentos de Programa y Resúmenes de la Reunión). 29 al 31 de jul. OIRSA, San Salvador, El Salvador. 7-12 p.
- Moore, NY; Bentley, S; Pegg, KG; Jones, DR. 1995. Fusarium wilt of banana. INIBAP. Musa Disease no.5:1-4.
- Morpurgo, R; Lopato, SV; Azfa, R; Novak, FJ. 1994. Selection parameters for resistance to *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* race 1 and race 4 on diploid banana (*Musa acuminata* Colla). Euphytica 75:121-129.
- Nel, B; Steinberg, C; Labuschagne, N; Viljoen, A. 2006. The potential of nonpathogenic *Fusarium oxysporum* and other biological control organisms for suppressing fusarium wilt of banana. Plant Pathology 55:217-223.
- Nelson, PE. 1981. Life cycle and epidemiology of *Fusarium oxysporum*. In Mace, ME; Bell, AA. Beckman, CH. eds. Fungal wilt disease of plants. Academic Press, New York. United States. P. 51-80.
- Nelson, PE. 1991. History of *Fusarium* systematics. Phytopathology 81:1045-1048.
- Niere, BI. 2001. Significance of non-pathogenic isolates of *Fusarium oxysporum* Schlecht: Fries for the biological control of the burrowing nematode *Radopholus similis* (Cobb) Thorne on tissue of cultured banana. Ph. D. Thesis, University of Bonn. DE. 118 p.
- Noreskal, M. 2010. Aislamientos de poblaciones endofíticas de Gros Michel para el biocontrol del Mal de Panamá. CATIE, Turrialba, CR. 43 diapositivas.

- Orjeda, G. 1998. Evaluation of Musa germplasm for resistance to Sigatoka diseases and Fusarium wilt. INIBAP (International Network for improvement of banana and Plantain). Montpellier, FR. 19-29 p.
- Ortiz, RA; Lopez, A; Ponchner, S; Segura, A. 2001. El cultivo del Banano. EUNED. San José, CR. 186 P.
- Padovan, A; Hannessy, C; Walduck, G. 2003. Identification of alternative hosts of *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* tropical race 4 in northern Australia. In 2nd International symposium on fusarium wilt on banana. Programme and abstracts. 22-26 sept. Salvador de Bahia, BR. 35 p.
- Papavizas, GC. 1985. *Trichoderma* and *Gliocadium*: Biology, ecology and potential for biocontrol. Annual. Review Phytopathology 23:23-54.
- Pegg, KG; Langdon, PW. 1987. Banana and breeding strategies. American Soc. of Agrof. Proceeding (54):45-70.
- Peng, HX; Sivasithamparam, K; Turner, DW. 1999. Clamydospore germination and Fusarium wilt of banana plantlets in suppressive and conducive soils are affected by physical and chemical factors. Soil Biology & Biochemistry 31(10):1363-1374.
- Perea, M. 1998. Consideraciones Biotecnológicas para el Mejoramiento de las Musáceas. In: Seminario Internacional sobre Producción de Plátano. Memorias. Memorias 4 al 8 de mayo. Quindío. Armenia, Colombia. CORPOICA- Universidad de Quindío-SENA. Comité Departamental de Cafetaleros del Quindío. p. 63-70
- Pérez, L; Batlle, A; Fonseca, J. 2003. *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* en Cuba: biología de las poblaciones, reacciones de los clones híbridos de la FHIA y biocontrol. In Rivas, G; Rosales, F. eds. Manejo convencional y alternativo de la Sigatoka negra, nematodos y otras plagas asociadas al cultivo de Musáceas en los trópicos. Taller Guayaquil, EC. p. 141-155.
- Pérez-Vicente, L. 2004. Fusarium wilt (Panama disease) of banana: an updating review of the current knowledge on the disease and its causal agent. In Orozco-Santos, M; Orozco-Romero, J; Velázquez-Monreal, J; Medina-Urrutia, V; Hernández, JA. eds. XVI REUNION INTERNACIONAL ACORBAT 2004 AXACA, MÉXICO. Memoria. p. 1-16.

- Pérez, L; Batlle, A; Chacón, J; Montenegro, V. 2009. Eficacia de *Trichoderma harzianum* A34 en el biocontrol de *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense*, agente causal de la marchitez por *Fusarium* o Mal de Panamá de los bananos en Cuba. *Fitosanidad* 13(4):259-263.
- Pérez, L; Batlle, A. 2010. Biología de Poblaciones de *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* : forma especiales, razas y grupo de compatibilidad vegetativa. In Pocasangre, LE; Perez, L; Martínez, E; Tapia, A; Guzmán, M; Brown, D. eds. Taller de entrenamiento sobre el diagnóstico y caracterización de la marchitez por *Fusarium* o Mal de Panamá. 22 al 26 de febrero, Turrialba, CR. 2 p.
- Pérez, L; Pocasangre, LE. 2010. Mal de Panamá causado por *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* : Recuento histórico. In Pocasangre, LE; Perez, L; Martínez, E; Tapia, A; Guzmán, M; Brown, D. eds. Taller de entrenamiento sobre el diagnóstico y caracterización de la marchitez por *Fusarium* o Mal de Panamá. 22 al 26 de febrero, Turrialba, CR. 4 p.
- Pieterse, CMJ; Van Pelt, JA; Ton, J; Parchmann, S; Mueller, MJ; Buchala, AJ; Metraux, JP; Van Loon, LC. 2000. Rhizobacteria-mediated induced systemic resistance (ISR) in *Arabidopsis* requires sensitivity to jasmonate and ethylene but is not accompanied by an increase in their production. *Physiological and Molecular Plant Pathology* 57(3):123-154.
- Pieterse, CMJ; Van Pelt, JA; Van Wees, SCM; Ton, J; Léon-Kloosterziel, KM; Keurentjes, JJB; Verhagen, BWM; Knoester, M; Van der Sluis, I; Bakker, PAHM; Van Loon, LC. 2001. Rhizobacteria-mediated induced systemic resistance: triggering, signalling and expression. *European Journal of Plant Pathology* 107:51-61.
- Pocasangre, LE. 2000. Biological enhancement of banana tissue culture plantlets with endophytic fungi for the control of the burrowing nematode *Radopholus similis* and the Panama disease (*Fusarium oxysporum* f.sp. *cubense*). Ph.D. Thesis. University Bonn, DE. 95 p.
- Pocasangre, LE; Sikora, RA; Vilich, V; Schuster, RP. 2000. Encuesta sobre los hongos endofíticos del banano de América Central y el cribado para el control biológico del nematodo barrenador (*Radopholus similis*). *InfoMUSA* 9(1):3-5.

- Pocasangre, LE. 2008a. Estado actual y manejo del Mal de Panamá en América Latina y el Caribe. *In* XVIII Reunión internacional de la Asociación para la cooperación en investigaciones de bananos en el Caribe y la América Tropical. Acorbat 10 al 14 de nov. Guayaquil, Ecuador. Resúmenes. p. 31.
- Pocasangre, LE. 2008b. Nuevas tendencias para el manejo de fitonemátodos en Musáceas en América Latina y el Caribe. *In* XVIII Reunión internacional de la Asociación para la cooperación en investigaciones de bananos en el Caribe y la América Tropical. Acorbat 10 al 14 de nov. Guayaquil, Ecuador. Resúmenes. p. 33.
- Pocasangre, LE. 2009. Estado actual y manejo del manejo de Panamá en América Latina y el Caribe. *In* REUNIÓN DE GRUPO DE INTERÉS SOBRE LOS RIESGOS DE LA RAZA TROPICAL 4 DE FUSARIUM, BBTV Y OTRAS PLAGAS DE MUSACEAS PARA LA REGIÓN DEL OIRSA, AMÉRICA LATINA Y EL CARIBE (Documentos de Programa y Resúmenes de la Reunión). 29 al 31 de julio. OIRSA, San Salvador, El Salvador. 18 p.
- Pocasangre, LE; Pérez, L. 2009. Impacto potencial de la entrada de la raza tropical 4 del mal de Panamá (*Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense*) en la industria bananera y platanera de América Latina y el Caribe. *In* REUNIÓN DE GRUPO DE INTERÉS SOBRE LOS RIESGOS DE LA RAZA TROPICAL 4 DE FUSARIUM, BBTV Y OTRAS PLAGAS DE MUSACEAS PARA LA REGIÓN DEL OIRSA, AMÉRICA LATINA Y EL CARIBE (Documentos de Programa y Resúmenes de la Reunión). 29 al 31 de julio. OIRSA, San Salvador, El Salvador. 25 p.
- Pocasangre, LE; Perez, L; Martínez, E; Tapia, A; Guzmán, M; Brown, D. 2010. Taller de entrenamiento sobre el diagnóstico y caracterización de la marchitez por *Fusarium* o Mal de Panamá. 22 al 26 de febrero, Turrialba, CR. 173 p.
- Pocasangre, L; Perez-Vicente, L. 2010. Impacto potencial de la entrada de la raza tropical 4 del Mal de Panamá (*Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense*) en la industria bananera y platanera de América Latina y el Caribe. *In* Pocasangre, LE; Perez, L; Martínez, E; Tapia, A; Guzmán, M; Brown, D. eds. Taller de entrenamiento sobre el diagnóstico y caracterización de la marchitez por *Fusarium* o Mal de Panamá. 22 al 26 de febrero, Turrialba, CR. 3 p.

- Ploetz, RC. 1989. Factors influencing the development of fusarium wilt of banana (Panama disease). *Phytopathology* 79:1181.
- Ploetz, R; Herbart, J; Sebasigari, K; Hernández, J; Pegg, K; Ventura, J; Mayato, L. 1989. Importance of Fusarium wilt different Banana-Growing Regions. 9-26. *In* Ploetz, RC. ed. *Fusarium Wilt of Banana*, APS Press, Amer. Phytopathol. Soc., St. Paul, MN USA. 140 pp.
- Ploetz, RC. 1990a. Population biology of *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense*. *In* *Fusarium Wilt of Banana*. APS Press, Amer. Phytopathology. Soc., St. Paul. MN USA. 63-76 p.
- Ploetz, RC. 1990b. Roundtable sessions. *In* *Fusarium Wilt of Banana*. APS Press, Amer. Phytopathology. Soc., St. Paul. MN USA. 135-138 p.
- Ploetz, RC. 1994. Panama disease: return of the first banana menace. *International journal of pest management* 40(4):326-336.
- Ploetz, RC; Pegg, KG. 1997. Fusarium wilt of banana and Wallace's line: was the disease originally restricted to the Indo-Malayan region? *Australasian Plant Pathology* 26:239-249.
- Ploetz, RC; Pegg, K. 2000. Fusarium Wilt. *In* Jones, DR. ed. *Diseases of Banana, Abaca and Enset*. CABI Publishing, Wallingford, UK. 143-159.
- Ploetz, RC. 2004. Diseases and pests: A review of their importance and management. *InfoMUSA* 3(2):11-16.
- Ploetz, RC. 2006. Fusarium wilt of bananas is caused by several pathogens referred to as *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense*. *Phytopathology* 96(6):653-656.
- Raguchander, T; Jayashree, K; Samiyappan, R. 1997. Management of Fusarium wilt of banana using antagonistic microorganisms. *Journal of Biological Control* 11:101-105.
- Rivero, AS. 2001. Moléculas activadoras de la inducción de la resistencia, incorporadas en programas de agricultura sostenible. *Manejo Integrado de Plagas y Agroecología* 61:4-11.
- Rowe, PR. Breeding bananas and plantains for resistance to Fusarium wilt: the track record. *In* Ploetz, RC.ed. *Fusarium Wilt of Banana*. APS Press, Amer. Phytopathology. Soc., St. Paul. MN USA. 115-119 p.

- Rutherford, MA; Kangire, A. 1998. Prospects for the management of *Fusarium* wilt of banana (Panama disease) in Africa. *In* Frison, EA; Gold, CS; Karamura EB; Sikora, RA. eds. Mobilizing IPM for sustainable banana production in Africa. Proceeding of a workshop on banana IPM hek. 179-188 p.
- Sandoval, I; López, MO; Bonilla, T; Tomas, Y. 1996. Hongos que atacan al clavel y antagonismo in vitro con *Trichoderma* spp. *Fitosanidad* 2(3-4):41-43.
- Sandoval, I; López, MO. 2000. Antagonismo de *Trichoderma harzianum* cepa A34 sobre *Macrophomina phaseolina* y otros patógenos fúngicos de frijol. *Fitosanidad* 4(3-4):69-72.
- Sarah, JL. 1989. Banana nematodes and their control in Africa. *Nematropica* 19(2):19-216.
- Saravanan, T; Muthusamy, M; Marimuthu, T. 2003. Development of integrated approach to manage the fusarial wilt of banana. *Crop Protection* 22:1117-1123.
- Sandoval, I; López, MO. 2001. Hiperparasitismo de *Trichoderma harzianum*, *T. viride* y *T. pseudokoningii* sobre diferentes hongos fitopatógenos. *Fitosanidad* 5(1):1-44.
- Seshu, KV; Ngode, L; Ssenyonga, JW; Wabule, M; Onyango, M; Adede, TO; Ngoze, S. 1998. Management of pests and diseases of banana in Kenya: a status report. *In* Frison, EA; Gold, CS; Karamura EB; Sikora, RA. eds. Mobilizing IPM for sustainable banana production in Africa. Proceeding of a workshop on banana IPM hek. 215-218 p.
- Silagyi, AJ. 2002. A survey of the disease incidence and severity of *Fusarium oxysporum* wilt, also known as Panama disease, in the banana cultivar 'Gros Michel' caused by *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* in small-scale organic farms within 2 regions of Costa Rica: Talamanca (Limón Province) and Turrialba (Cartago Province). University of Florida. 12 p.
- Silagyi, AJ; Pocasangre, LE. 2003. Current estatus of *Fusarium* wilt on Gros Michel in smallholdings in Costa Rica. *In* 2nd International symposium on fusarium wilt on banana. 22-26 September. Programme and abstracts. Salvador de Bahia, BR. p. 12
- Sikora, RA. 1992. Management of the antagonistic potential in agricultural ecosystems for biological control of plant parasitic nematodes. *Annual Review of Phytopathology* 30:245-270.

- Sivan, A; Chet, I. 1987. Biological control of *Fusarium* crown rot of tomato by *Trichoderma harzianum* under field conditions. *Plant Disease* 71(7):587-692.
- Sivan, A; Chet, I. 1989. The possible role of competition between *Trichoderma harzianum* and *Fusarium oxysporum* on rhizosphere colonization. *Phytopathology* 79(2):198-203.
- Simmonds, NW. 1959. Bananas. Longman, London, UK. 466 p.
- Simmonds, NW. 1962. The evolution of the bananas. Longman, London, UK. 170 p.
- Scher, FM; Baker, R. 1980. Mechanism of biological control in a *Fusarium*-Suppressive soil. *Phytopathology* 70(5):412-417.
- Shi, Y; Lou, K; Li, C. 2009. Promotion of plant growth by phytohormone producing endophytic microbes of sugar beet. *Biol Fertil Soils*. 45:645-653.
- Smith, EF. 1910. A Cuban banana disease. (abstract) *Science* 31:754-755.
- Smith, MK. 1998. A review of factors influencing the genetic stability of micropopagated bananas. *Fruits* 43(4):219-223.
- Smith, MK; Whiley, AW; Searle, C; Langdon, PW; Schaffer, B; and Pegg, KG. 1998. Micropropagated bananas are more susceptible to *Fusarium* wilt than plants grown from conventional material. *Australian Journal of Agricultural Research*, 49:1133-1139.
- Soto, M. 1990. Bananos. Cultivos y comercialización. 2 ed. San José, CR. 627 pp.
- Stover, RH. 1959a. A rapid and simple pathogenicity Test for Detecting Virulent Clones *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* using Seedlings of *Musa balbisiana*. *Nature* 184(14):1591-1592.
- Stover, RH. 1959b. Studies on *Fusarium* wilt of banana. IV. Clonal differentiation among wild type isolates of *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense*. *Canadian Journal of Botany* 37:245-255.
- Stover, RH; Waite, BH. 1954. Colonization of banana roots by *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* and other soil fungi. *Phytopathology* 44:689-693.

- Stover, RH; Waite, BH. 1960. Studies on Fusarium Wilt of Bananas. V. Pathogenicity and distribution of *F. oxysporum* f. sp. *cubense* races 1 and 2. Canadian Journal of Botany 38:51-61.
- Stover, RH. 1962. Fusarial wilt (Panama disease) of bananas and other *Musa* species. Commonw. Mycol. Instit. Phytopath. Pap. 4:117 pp.
- Stover, RH. 1986. Disease management strategies and survival of the banana industry. Annual review of phytopathology 24:83-91.
- Stover, RH; Simmonds, NW. 1987. Bananas. 3 ed. Longmans Scientific and Technical, Harlow, Essex, UK. 468 p.
- Su, HJ; Hwang, SC; Ko, WH. 1986. Fusarial Wilt of Cavendish Bananas in Taiwan. Plant Disease 70(9):814-818.
- Thangavelu, R; Velazhahan, R; Santhiamoorthy, S. 2003. Biocontrol of fusarium wilt disease. In 2nd International symposium on fusarium wilt on banana. Programme and abstracts. 22-26 sept. Salvador de Bahia, BR. 34 p.
- Thangavelu, R; Palaniswami, A; Velazhahan, R. 2004. Mass production of *Trichoderma harzianum* for managing fusarium wilt of banana. Agriculture Ecosystems & Environment 103(1):259-263.
- Ting, ASY; Meon, S; Jugan, K; Anuar, AR. 2003. Effect of artificially induced suppressive soil on Fusarium wilt. InfoMUSA 12(1):33-34.
- Ting, ASY; Meon, S; Kadir, J; Radu, S; Singh, G. 2008. Endophytic microorganisms as potential growth promoters of banana. BioControl 53:541-553.
- Thurston, H.D. 1989. Enfermedades de cultivos en el trópico. Trad. J.J. Galindo. Centro Agronómico Tropical de Investigación y Enseñanza. p. 113-123.
- Tronsmo, A. 1996. *TRICHODERMA HARZIANUM* IN BIOLOGICAL CONTROL OF FUNGAL DISEASES. In Hall, R. ed. Principles and Practice of Managing Soilborne Plant Pathogens. APS Press. American Phytopathological Soc. St. Paul, MN, USA. p. 213-216
- Trujillo, EE. 1963. Pathological-Anatomical studies of Gros Michel banana affected by Fusarium Wilt. Phytopathology 53:162-166.

- Trujillo, EE and Snyder, WC. 1963. Uneven Distribution of *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* in Honduras soils. *Phytopathology* 53:167-170.
- Tushemereirwe, WK; Bagabe, M. 1998. Review of disease distribution and pest status in Africa. *In* Frison, EA; Gold, CS; Karamura, EB; Sikora, RA. eds. Mobilizing IPM for sustainable banana production in Africa. Proceedings of a workshop on banana IPM held in Nelspruit, South Africa-23-28 November. Montpellier, France, International Network for the Improvement of Banana and Plantain. 138-141.
- Umaña, G; Saenz, M; Umaña, D. 2000. Manejo postcosecha en banano y cacao orgánicos. Asociación de Pequeños Productores de Talamanca APPTA. Labor. Postcosecha. Centro de investigaciones Agronómicas (CIA), Universidad de Costa Rica. p.37-39.
- Van Loon, LC; Bakker, PAHM; Pieterse, CMJ. 1998. Systemic resistance induced by rhizosphere bacteria. *Annual Review of Phytopathology* 36:453-483.
- Vinale, F; Sivasithamparam, K; Ghisalberti, EL; Marra, R; Woo, SL; Lorito, M. 2008. *Trichoderma*-plant-pathogen interactions. *Soil Biology & Biochemistry* 40:1-10.
- Vuylsteke, DR; Hartaman, JB. 1998. Advances in breeding for host plant resistance to banana diseases. *In* Frison, EA; Gold, CS; Karamura EB; Sikora, RA. eds. Mobilizing IPM for sustainable banana production in Africa. Proceeding of a workshop on banana IPM held. 165-176 p.
- Waite, BH; Dunlap, VC. 1953. Preliminary host range studies with *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense*. *Plant Disease Reporter* 37:79-80.
- Waite, BH. 1977. Inoculation studies and natural infection of banana varieties with races 1 and 2 of *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense*. *Plant Disease Reporter* 61(1):15-19.
- Wang, C; Knill, E; Glick, BR; Défago, G. 2000. Effect of transferring 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid (ACC) deaminase genes into *Pseudomonas fluorescens* strain CHAO and its *gacA* derivative CHA96 on their growth-promoting and disease-suppressive capacities. *Canadian Journal of Microbiology* 46:898-907.
- Wardlaw, C.W. 1961. Banana diseases, including plantains and abaca. Longmans, Green and Co. London. 648 p.

- Weber, OB; Muniz, CR; Vitor, AO; Freire, FCO; Oliveira, VM. 2007. Interaction of endophytic diazotrophic bacteria and *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* on plantlets of banana Maça. Plant Soil 298(1-2):47-56.
- Weindling, R.1934. Studies on a lethal principle effective in the parasitic action of *Trichoderma lignorum* on *Rhizoctonia solani* and other fungi. Phytopathology 24:153-1179.
- Woo, SL; Scala, F; Ruocco, M; Lorito, M. 2006. The molecular biology of the interactions between *Trichoderma* spp., Phytopathogenic Fungi, and plants. Phytopathology 96:181-185.
- Woo, SL; Lorito, M. 2007. Exploiting the interactions between fungal antagonists, pathogens and the plant for biocontrol. In Vurro, M; Gressel, J. eds. Novel Biotechnologies for biocontrol Agent Enhancement and Management. Springer. 107-130 p.
- Yadidia, I; Benhamoun, N; Chet, I. 1999. Induction of defense responses in cucumber plants (*Cucumis sativus* L.) by the biocontrol agent *Trichoderma harzianum*. Applied and Environmental Microbiology 65(3):1061-1070.
- Yadidia, I; Shores, M; Kerem, Z; Benhamou, N; Kapulnik, Y; Chet, I. 2003. Concomitant Induction of system resistance to *Pseudomonas syringae* pv. *lachrymans* in cucumber by *Trichoderma asperellum* (T203) and accumulation of Phytoalexins. Applied and Environmental Microbiology 69(12):7343-7353.
- Yamaguchi, K; Sano, T; Arita, M; Takahashi, M. 1992. Biocontrol of Fusarium wilt of tomato and Verticillium wilt of eggplant by non-pathogenic *F. oxysporum*. Annals of the Phytopathological Society of Japan 58(2):188-194.
- Zambrano, AY; Martínez, G; Gutiérrez, Z; Manzanilla, E; Vicente-Villardón, JL; Demey, JR. 2007. Marcador RAPD asociado a la resistencia de *Fusarium oxysporum* en Musa. INCI 32(11):775-779.
- Zhang, Y; Liu, K; Xiang, M; Liu, R. 2004. Studies on the control *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* with *Trichoderma*. Journal of Zhejiang University (Agriculture & Life Sciences) 30(4):406-406.

ANEXO

Anexo 1. Modelos lineales generales y mixtos para el amarillamiento y marchitez de Fusarium oxysporum f. sp. cubense en la prueba de biocontrol

Análisis de la varianza

Variable	N	R ²	R ² Aj	CV
Amarillamiento	1980	0,24	0,23	59,72

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)					
F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo	1069,92	47	22,76	13,24	<0,0001
Tratamiento	604,87	42	14,40	8,38	<0,0001
Evaluación	465,05	5	93,01	54,10	<0,0001
Error	3321,44	1932	1,72		
Total	4391,36	1979			

Test:LSD Fisher Alfa=0.05 DMS=0.53656

Error: 1.7192 gl: 1932

Tratamiento	Amarillamiento										
Testigo Absoluto	1	A									
TC9-FOC2	1,4	A	B								
TP3-FOC4	1,48	A	B	C							
TCL1-FOC2	1,52	A	B	C							
TC2-FOC2	1,6	B	C	D							
TV3-FOC4	1,63	B	C	D	E						
TD6-FOC2	1,67	B	C	D	E	F					
TV4-FOC2	1,69	B	C	D	E	F					
TS2-FOC2	1,71	B	C	D	E	F					
TC9-FOC4	1,73	B	C	D	E	F					
TD3-FOC2	1,73	B	C	D	E	F					
TD6-FOC4	1,74	B	C	D	E	F					
TB1-FOC2	1,75	B	C	D	E	F					
TJ5-FOC2	1,76	B	C	D	E	F					
TC8-FOC2	1,81	B	C	D	E	F	G				
TCL1-FOC4	1,9	B	C	D	E	F	G	H			
TC6-FOC2	1,98	C	D	E	F	G	H	I			
Testigo Ref,-FOC2	2,07	D	E	F	G	H	I	J			
TC12-FOC2	2,1	D	E	F	G	H	I	J			
TM1-FOC2	2,13	D	E	F	G	H	I	J			
TJ5-FOC4	2,13	D	E	F	G	H	I	J			
TD3-FOC4	2,13	D	E	F	G	H	I	J			
TCL4-FOC4	2,15	E	F	G	H	I	J				
TD7-FOC4	2,17	F	G	H	I	J	K				
TD7-FOC2	2,17	F	G	H	I	J	K				
TCL4-FOC2	2,31	G	H	I	J	K	L				

TM1-FOC4	2,38	H	I	J	K	L	M
TCL2-FOC4	2,38	H	I	J	K	L	M
TCL6-FOC2	2,4	H	I	J	K	L	M
TC6-FOC4	2,46	I	J	K	L	M	
TC12-FOC4	2,54	J	K	L	M	N	
TV3-FOC2	2,57	J	K	L	M	N	
TP3-FOC2	2,58	J	K	L	M	N	
TCL6-FOC4	2,58	J	K	L	M	N	
TC2-FOC4	2,69	K	L	M	N	O	
TC8-FOC4	2,71	L	M	N	O		
TE5-FOC4	2,83	L	M	N	O	P	
TE5-FOC2	2,9	M	N	O	P		
TV4-FOC4	3,05	N	O	P			
TS2-FOC4	3,13	O	P				
TCL2-FOC2	3,25	P					
TB1-FOC4	3,31	P					
T.-FOC4	3,35	P					

Letras distintas indican diferencias significativas ($p \leq 0.05$)

Variable	N	R ²	R ² Aj	CV
Marchitez	1980	0,25	0,23	60,66

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo	1114,45	47	23,71	13,91	<0,0001
Tratamiento	563,29	42	13,41	7,87	<0,0001
Evaluación	551,16	5	110,23	64,66	<0,0001
Error	3293,48	1932	1,70		
Total	4407,94	1979			

Test:LSD Fisher Alfa=0.05 DMS=0.53430

Error: 1.7047 gl: 1932

Tratamiento	Marchitez							
Testigo Absoluto	1	A						
TC9-FOC2	1,4	A	B					
TP3-FOC4	1,45	A	B	C				
TCL1-FOC2	1,52	A	B	C	D			
TV3-FOC4	1,58	B	C	D	E			
TC2-FOC2	1,58	B	C	D	E			
TD6-FOC2	1,62	B	C	D	E	F		
TV4-FOC2	1,69	B	C	D	E	F	G	
TS2-FOC2	1,69	B	C	D	E	F	G	H
TD3-FOC2	1,71	B	C	D	E	F	G	H
TC9-FOC4	1,71	B	C	D	E	F	G	H

TB1-FOC2	1,73	B C D E F G H I
TJ5-FOC2	1,74	B C D E F G H I
TD6-FOC4	1,74	B C D E F G H I
TC8-FOC2	1,77	B C D E F G H I
TCL1-FOC4	1,86	B C D E F G H I J
TC6-FOC2	1,98	C D E F G H I J K
TC12-FOC2	2,02	D E F G H I J K L
Testigo Ref,-FOC2	2,02	D E F G H I J K L M
TM1-FOC2	2,04	D E F G H I J K L M
TJ5-FOC4	2,06	E F G H I J K L M
TCL4-FOC4	2,1	E F G H I J K L M
TD3-FOC4	2,12	F G H I J K L M N
TM1-FOC4	2,15	F G H I J K L M N O
TD7-FOC4	2,17	G H I J K L M N O
TD7-FOC2	2,17	G H I J K L M N O
TCL2-FOC4	2,23	H I J K L M N O
TCL4-FOC2	2,25	I J K L M N O
TCL6-FOC2	2,4	J K L M N O P
TC6-FOC4	2,46	K L M N O P
TC12-FOC4	2,48	K L M N O P
TCL6-FOC4	2,52	L M N O P Q
TP3-FOC2	2,54	L M N O P Q
TV3-FOC2	2,57	M N O P Q
TC2-FOC4	2,65	N O P Q
TC8-FOC4	2,67	O P Q R
TE5-FOC4	2,81	P Q R S
TE5-FOC2	2,93	P Q R S
TS2-FOC4	3,04	Q R S
TCL2-FOC2	3,04	Q R S
TV4-FOC4	3,05	Q R S
TB1-FOC4	3,22	R S
Testigo Ref,-FOC4	3,25	S

Letras distintas indican diferencias significativas ($p \leq 0.05$)

Anexo 2. Modelos lineales generales y mixtos para la decoloración del cormo y las medias de los efectos principales de los Trichoderma spp., para Fusarium oxysporum f. sp. cubense

Análisis de la varianza

Variable	N	R ²	R ² Aj	CV
RAIZ Decoloracion de	304	0,17	0,04	24,58

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo	9,25	39	0,24	1,34	0,0938
trico	5,01	19	0,26	1,49	0,0875
foc	0,81	1	0,81	4,62	0,0326
trico*foc	3,40	19	0,18	1,01	0,4441
Error	46,60	264	0,18		
Total	55,84	303			

Test:LSD Fisher Alfa=0.05 DMS=0.30018

Error: 0.1765 gl: 264

Trichoderma	D. cormo	
TC9	1,48	A
TD3	1,52	A B
TC8	1,57	A B C
TC12	1,58	A B C
TD6	1,59	A B C
TJ5	1,61	A B C
TCL1	1,62	A B C D
TC2	1,65	A B C D E
TP3	1,66	A B C D E
TCL4	1,69	A B C D E
TD7	1,73	A B C D E
TC6	1,74	A B C D E
TV4	1,76	A B C D E
TCL6	1,8	B C D E
TS2	1,8	B C D E
TCL2	1,83	C D E
TB1	1,85	C D E
TV3	1,85	C D E
TM1	1,91	D E
TE5	1,94	E

Letras distintas indican diferencias significativas (p<= 0.05)

Anexo 3. Modelos lineales generales y mixtos para peso radical, peso del follaje y peso de la planta

```
modelo007_Peso.radical.g_REML<-glS(Peso.radical.g~1+Tratamiento
,weight=varComb(varIdent(form=~1|Cluster))
,method="REML"
,na.action=na.omit
,data=R.data06)
```

Resultados para el modelo: modelo007_Peso.radical.g_REML

Variable dependiente: *Peso.radical.g*

Medidas de ajuste del modelo

N	AIC	BIC	logLik	Sigma R2_0
327	1469,00	1640,50	-687,50	3,33 0,17

AIC y BIC menores implica mejor

Pruebas de hipótesis secuenciales

	numDF	F-value	p-value
(Intercept)	1	3445,57	<0,0001
Tratamiento	42	2,48	<0,0001

Medias ajustadas para Tratamiento

LSD Fisher (Alfa=0.05)

Procedimiento de corrección de p-valores: No

Tratamiento	Peso radical
TCL1-FOC2	9,56 A
TC9-FOC2	8,55 A B
TC12-FOC2	8,3 A B C
TC9-FOC4	8,19 A B C
TC8-FOC2	8,11 A B C D
TS2-FOC2	8,03 A B C D
TD7-FOC4	7,83 A B C D
TCL6-FOC4	7,68 A B C D E
TB1-FOC2	7,4 A B C D E
TJ5-FOC2	7,3 A B C D E
TCL4-FOC4	7,16 B C D E
TCL1-FOC4	7,14 B C D E
TC2-FOC2	7,1 B C D E
TD6-FOC2	7,06 B C D E
TM1-FOC4	7,05 B C D E
TD3-FOC4	6,99 B C D E
TC6-FOC2	6,96 B C D E
TP3-FOC4	6,83 B C D E
TJ5-FOC4	6,76 B C D E
TCL4-FOC2	6,75 B C D E

TD3-FOC2	6,69	B	C	D	E
Testigo Ref,-FOC2	6,67	B	C	D	E
TD7-FOC2	6,58	B	C	D	E
Testigo Absoluto	6,45	B	C	D	E
TC12-FOC4	6,41	B	C	D	E
Testigo Ref,-FOC4	6,34	B	C	D	E
TV3-FOC2	6,31	B	C	D	E
TC8-FOC4	6,24	C	D	E	
TP3-FOC2	6,04	C	D	E	
TCL2-FOC2	5,96	C	D	E	
TM1-FOC2	5,89	C	D	E	
TCL2-FOC4	5,88	C	D	E	
TE5-FOC2	5,83	C	D	E	
TD6-FOC4	5,73	D	E		
TV3-FOC4	5,73	D	E		
TC2-FOC4	5,73	D	E		
TV4-FOC4	5,37	D	E		
TV4-FOC2	5,14	D	E		
TB1-FOC4	5,13	D	E		
TE5-FOC4	5,08	E			
TS2-FOC4	5,06	E			
TC6-FOC4	4,96	E			
TCL6-FOC2	4,91	E			

Letras distintas indican diferencias significativas ($p \leq 0.05$)

```
modelo006_Peso.foliar.g_REML<-glS(Peso.foliar.g~1+Tratamiento
,weight=varComb(varIdent(form=~1|Cluster))
,method="REML"
,na.action=na.omit
,data=R.data06)
```

Resultados para el modelo: modelo006_Peso.foliar.g_REML

Variable dependiente: Peso.foliar.g

Medidas de ajuste del modelo

N	AIC	BIC	logLik	Sigma R2	0
327	1937,93	2109,43	-921,97	8,03	0,17

AIC y BIC menores implica mejor

Pruebas de hipótesis secuenciales

	numDF	F-value	p-value
(Intercept)	1	3884,17	<0,0001
Tratamiento	42	2,15	0,0001

Medias ajustadas para Tratamiento*LSD Fisher (Alfa=0.05)**Procedimiento de corrección de p-valores: No*

Tratamiento	Peso foliar
TCL1-FOC2	21,46 A
TS2-FOC2	20,59 A B
TC9-FOC4	19,83 A B C
TD7-FOC4	19,44 A B C
TP3-FOC4	19,44 A B C D
TD7-FOC2	19,25 A B C D E
TJ5-FOC2	19,17 A B C D E F
TC12-FOC2	19,10 A B C D E F
TC6-FOC2	19,04 A B C D E F
TC8-FOC2	18,53 A B C D E F
TC9-FOC2	18,50 A B C D E F
Testigo Absoluto	18,33 A B C D E F
TB1-FOC2	18,30 A B C D E F
TD6-FOC2	18,26 A B C D E F
TD3-FOC2	18,09 A B C D E F
TM1-FOC4	18,09 A B C D E F
TJ5-FOC4	17,76 A B C D E F
TM1-FOC2	17,50 A B C D E F
TC2-FOC2	17,43 A B C D E F
TCL6-FOC4	17,31 A B C D E F
TD3-FOC4	17,15 A B C D E F
TCL1-FOC4	17,06 A B C D E F
TCL4-FOC4	16,46 A B C D E F
TC12-FOC4	16,40 A B C D E F
TV3-FOC4	16,14 A B C D E F
TV4-FOC2	16,05 A B C D E F
TE5-FOC2	15,20 A B C D E F
TC8-FOC4	15,00 B C D E F
TD6-FOC4	14,99 B C D E F
TV4-FOC4	14,91 B C D E F
Testigo Ref,-FOC4	14,81 B C D E F
TCL2-FOC4	14,68 B C D E F
TV3-FOC2	14,66 B C D E F
TCL4-FOC2	14,28 C D E F
TC2-FOC4	13,89 D E F
TCL2-FOC2	13,89 D E F
Testigo Ref,-FOC2	13,70 E F
TC6-FOC4	13,65 E F

TP3-FOC2	13,58 F
TE5-FOC4	12,96 F
TCL6-FOC2	12,90 F
TS2-FOC4	12,06 F
TB1-FOC4	11,72 F

Letras distintas indican diferencias significativas ($p \leq 0.05$)

```
modelo008_Peso.planta.g_REML<-glsl(Peso.planta.g~1+Tratamiento
,weight=varComb(varIdent(form=~1|Cluster))
,method="REML"
,na.action=na.omit
,data=R.data06)
```

Resultados para el modelo: modelo008_Peso.planta.g_REML

Variable dependiente: *Peso.planta.g*

Medidas de ajuste del modelo

N	AIC	BIC	logLik	Sigma R2 0
327	2118,84	2290,35	-1012,42	11,15 0,17

AIC y BIC menores implica mejor

Pruebas de hipótesis secuenciales

	numDF	F-value	p-value
(Intercept)	1	4215,75	<0,0001
Tratamiento	42	2,39	<0,0001

Medias ajustadas para Tratamiento

LSD Fisher (Alfa=0.05)

Procedimiento de corrección de p-valores: No

Tratamiento	Peso de la planta
TCL1-FOC2	31,03 A
TS2-FOC2	28,61 A B
TC9-FOC4	28,01 A B C
TC12-FOC2	27,40 A B C
TD7-FOC4	27,27 A B C
TC9-FOC2	27,05 A B C
TC8-FOC2	26,64 A B C D
TJ5-FOC2	26,47 A B C D E
TP3-FOC4	26,27 A B C D E
TC6-FOC2	26,00 A B C D E
TD7-FOC2	25,83 A B C D E
TB1-FOC2	25,70 A B C D E
TD6-FOC2	25,31 A B C D E

TM1-FOC4	25,14	A	B	C	D	E
TCL6-FOC4	24,99	A	B	C	D	E
TD3-FOC2	24,78	A	B	C	D	E
Testigo Absoluto	24,78	A	B	C	D	E
TC2-FOC2	24,53	A	B	C	D	E
TJ5-FOC4	24,53	A	B	C	D	E
TCL1-FOC4	24,20	A	B	C	D	E
TD3-FOC4	24,14	A	B	C	D	E
TCL4-FOC4	23,63	A	B	C	D	E
TM1-FOC2	23,39	A	B	C	D	E
TC12-FOC4	22,81	B	C	D	E	
TV3-FOC4	21,86	B	C	D	E	
TC8-FOC4	21,24	B	C	D	E	
TV4-FOC2	21,19	B	C	D	E	
Testigo Ref,-FOC4	21,15	B	C	D	E	
TE5-FOC2	21,03	B	C	D	E	
TCL4-FOC2	21,03	B	C	D	E	
TV3-FOC2	20,97	B	C	D	E	
TD6-FOC4	20,71	C	D	E		
TCL2-FOC4	20,55	C	D	E		
Testigo Ref,-FOC2	20,37	C	D	E		
TV4-FOC4	20,29	C	D	E		
TCL2-FOC2	19,84	C	D	E		
TC2-FOC4	19,61	D	E			
TP3-FOC2	19,61	D	E			
TC6-FOC4	18,61	D	E			
TE5-FOC4	18,04	D	E			
TCL6-FOC2	17,81	D	E			
TS2-FOC4	17,13	E				
TB1-FOC4	16,85	E				

Letras distintas indican diferencias significativas ($p \leq 0.05$)

Anexo 4. Correlación de las variables repuestas de la prueba de biocontrol y antibiosis

Coefficientes de correlación

Correlación de Spearman: Coeficientes/probabilidades

	Red. Cr. R%	Incidence	Amarillamiento	Marchitez	Decol. Co	Altura	No. Hoj.	D. pseud.	Anch. ter. h.	Peso radical	Peso follaje	Peso planta
Red. Cr. R%	1	0,98	0,83	0,75	0,7	0,11	0,35	0,11	0,46	0,48	0,43	0,41
% Incidence	-3,20E-03	1	0,03	0,03	0,96	0,79	0,3	0,66	0,75	0,55	0,92	0,73
Amarillamiento	-0,03	0,34	1	1,10E-10	2,20E-03	0,03	0,14	0,06	0,71	5,00E-04	8,60E-06	1,30E-05
Marchitez	-0,05	0,33	1	1	4,10E-03	0,03	0,15	0,05	0,83	3,70E-04	6,50E-06	9,10E-06
Decol. Corr	-0,06	-0,01	0,49	0,46	1	0,32	0,75	0,73	0,69	2,20E-03	0,01	0,01
Altura	-0,25	0,04	-0,34	-0,34	-0,16	1	0,35	0,45	0,39	0,75	0,13	0,17
No. Hoj.	0,15	-0,16	-0,23	-0,22	0,05	0,14	1	0,24	0,92	0,45	0,92	0,99
D. pseud.	-0,25	-0,07	-0,29	-0,3	0,06	0,12	0,18	1	0,75	0,05	0,02	0,01
Anch. ter. h.	0,12	0,05	-0,06	-0,03	0,06	0,13	0,02	0,05	1	0,29	0,8	0,69
Peso radical	0,11	0,09	-0,54	-0,55	-0,49	0,05	-0,12	0,31	-0,16	1	1,60E-07	7,10E-09
Peso follaje	0,12	0,02	-0,69	-0,7	-0,4	0,24	0,02	0,35	-0,04	0,81	1	2,20E-10
Peso planta	0,13	0,05	-0,67	-0,68	-0,44	0,21	2,10E-03	0,38	-0,06	0,89	0,98	1

Anexo 5. Ranking para los mejores hongos endofíticos de *Trichoderma* spp., en el presente estudio

Tratamientos	[0,1] Altura	[0,1] No. Hoj.	[0,1] D. pseud.	[0,1] Anch. ter. h.	[0,1] Peso radical	[0,1] Peso follaje	incid	amarill	decoco	march	Suma
TC9-FOC2	0,37	0,83	0,56	0,27	0,78	0,7	0,13	0,83	1	0,18	5,64
TCL1-FOC2	0,58	0,51	0,47	0,04	1	1	0,13	0,78	0,75	0,23	5,5
TJ5-FOC2	0,32	0,9	0,67	0,03	0,51	0,76	0,63	0,68	0,65	0,33	5,48
TC6-FOC2	0,45	0,73	0,59	0,54	0,44	0,75	0,38	0,58	0,42	0,44	5,31
TP3-FOC4	0,51	0,9	0,51	0,32	0,41	0,79	0,25	0,8	0,6	0,2	5,29
TD7-FOC2	0,41	0,68	0,72	0,48	0,36	0,77	0,13	0,5	0,48	0,52	5,04
TC8-FOC2	0,43	0,7	0,66	0,01	0,69	0,7	0,13	0,66	0,73	0,34	5,03
TV3-FOC4	0,54	0,77	0,48	1	0,18	0,45	0,38	0,73	0,23	0,26	5,02
TD6-FOC2	0,59	0,53	0,72	0,12	0,46	0,67	0,13	0,71	0,8	0,28	5,01
TB1-FOC2	0,5	0,46	1	0,21	0,54	0,68	0,25	0,68	0,28	0,32	4,91
TC2-FOC2	0,62	0,7	0,19	0,2	0,47	0,59	0,38	0,74	0,65	0,26	4,79
TC9-FOC4	0,39	0,7	0,13	0,03	0,71	0,83	0	0,69	1	0,32	4,79
TD3-FOC2	0,47	0,45	0,67	0,25	0,38	0,65	0	0,69	0,85	0,32	4,72
TD7-FOC4	0,38	0,68	0,4	0,27	0,63	0,79	0	0,5	0,48	0,52	4,65
TC12-FOC2	0,39	0,24	0,46	0,32	0,73	0,76	0	0,53	0,76	0,45	4,65
TJ5-FOC4	0,43	0,61	0,3	0,24	0,4	0,62	0,38	0,52	0,65	0,47	4,61
TD6-FOC4	0,42	0,9	0,35	0,15	0,18	0,34	0,38	0,69	0,8	0,33	4,52
TS2-FOC2	0,34	0,46	0,49	0	0,67	0,91	0,25	0,7	0,35	0,31	4,47
TC8-FOC4	0,52	0,98	0,37	0,07	0,29	0,34	0,13	0,27	0,73	0,74	4,43
T. abs.	0,44	0,51	0,33	0,12	0,33	0,68	1	1	0	0	4,4
TCL4-FOC2	0,32	0,75	0,46	0,35	0,4	0,26	0,25	0,44	0,61	0,56	4,39
TCL1-FOC4	0,29	0,53	0,21	0,04	0,48	0,55	0,38	0,62	0,75	0,38	4,24
TCL6-FOC4	0,47	0,3	0,47	0,25	0,6	0,57	0	0,33	0,33	0,68	4
TCL4-FOC4	0,28	0,57	0,31	0,1	0,48	0,49	0,13	0,51	0,61	0,49	3,96
TD3-FOC4	0,29	0,06	0,33	0,22	0,45	0,56	0,13	0,52	0,85	0,5	3,89
TV4-FOC2	0,49	0,83	0,41	0,25	0,05	0,44	0	0,71	0,35	0,31	3,84
TV3-FOC2	0,53	0,69	0,47	0,15	0,3	0,13	0,33	0,23	0,7	0,38	3,83
TM1-FOC2	0,37	0,75	0,46	0,17	0,21	0,59	0,13	0,52	0,11	0,46	3,78
TCL6-FOC2	1	0,59	0,22	0,11	0	0,12	0,25	0,4	0,33	0,62	3,65
TM1-FOC4	0,34	0,75	0,37	0,04	0,46	0,65	0	0,41	0,11	0,51	3,64
TP3-FOC2	0,33	0,38	0,63	0,12	0,24	0,19	0,13	0,33	0,6	0,68	3,64
TE5-FOC4	0,33	0,9	0,47	0,32	0,04	0,13	0,25	0,22	0	0,8	3,45
TV4-FOC4	0,41	0,55	0,21	0,28	0,1	0,33	0,13	0,13	0,35	0,91	3,39
TC12-FOC4	0,44	0,02	0,03	0,33	0,32	0,48	0	0,34	0,76	0,66	3,39
TS2-FOC4	0,45	1	0,38	0,1	0,03	0,03	0	0,09	0,35	0,91	3,34
TE5-FOC2	0,24	0,51	0,53	0,04	0,2	0,36	0,13	0,19	0	0,86	3,06
TC2-FOC4	0,56	0,26	0	0,16	0,18	0,22	0	0,28	0,65	0,73	3,04
TC6-FOC4	0,19	0,73	0,05	0,22	0,01	0,2	0,13	0,38	0,42	0,65	2,97
TCL2-FOC2	0,31	0,49	0,38	0,06	0,23	0,22	0	0,04	0,22	0,91	2,85
TB1-FOC4	0,28	0,13	0,44	0,09	0,05	0	0,38	0,02	0,28	0,99	2,65
TCL2-FOC4	0,16	0	0,05	0,4	0,21	0,3	0,13	0,41	0,22	0,55	2,44